

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biologických a lékařských věd

Sledování exprese vybraných markerů kaskády pro transformující růstový  
faktor u myšího modelu aterosklerózy

The studying of some markers of transforming growth factor pathway in  
mouse model of atherosclerosis

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:

Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, PhD.

Hradec Králové 2010

Lukáš Pagurko

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

„Rád bych poděkoval Doc. PharmDr. Petru Nachtigalovi, PhD. za odborné vedení a cenné rady při sestavování mé diplomové práce. Mé poděkování rovněž patří mé rodině a všem svým blízkým za velkou podporu.“

## **Abstrakt**

Lukáš Pagurko

Sledování exprese vybraných markerů kaskády pro transformující růstový faktor u myšího modelu aterosklerózy.

Diplomová práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Farmacie

Cíl práce:

Sledovali jsme expresi endoteliální NO syntázy (eNOS) v aterosklerotických plátech myší za použití imunohistochemických metod. Cílem bylo prokázat jestli atorvastatin ovlivňuje expresi eNOS bez hypolipidemických účinků.

Metody:

Použili jsme samice kmene C57BL/6J s dvojitým deficitem apolipoproteinu E (apoE) a LDL-receptoru (LDLr) ve věku 16 týdnů. Byla provedena biochemická analýza vzorků krve a imunohistochemická analýza segmentů tkáně tvořených aortou a horní polovinou srdce. Pro detekci exprese eNOS byla použita metodika EnVision s detekcí pomocí DAB.

Výsledky:

V biochemické analýze jsme zjistili, že osmitýdenní podávání atorvastatinu statisticky významně zvýšilo hladiny celkového cholesterolu. U všech řezů v kontrolní i atorvastatinové skupině byla pozorována přítomnost aterosklerotických lézí, přičemž u řady z nich byla již nalezena ateromová nekrotická jádra. Podávání atorvastatinu vedlo k signifikantnímu poklesu velikosti aterosklerotických plátů ve srovnání s neléčenou skupinou. Podávání atorvastatinu dále vedlo k výraznému navýšení exprese eNOS zejména na povrchu aterosklerotických plátů.

Závěr:

Byl prokázán pozitivní vliv podávání atorvastatinu na expresi eNOS a to bez hypolipidemického účinku.

## **Abstracts**

Lukáš Pagurko

The studying of some markers of transforming growth factor pathway in mouse model of atherosclerosis.

Diploma thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Pharmacy

Background:

We observed the expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in mice atherosclerotic plaque by using imunohistochemical methods. The aim was to prove nonlipid-lowering effects of atorvastatin to affect the expression of eNOS.

Methods:

Female apoE and LDLr deficient mice, aged 16 weeks were used in the study. Biochemical analysis of blood samples and imunohistochemical analysis of the tissue segments were performed. For identification of eNOS expression was used EnVision method with DAB visualization.

Results:

We found out in biochemical analysis that 8weeks doses of atorvastatin significantly increases levels of overall cholesterol. Presence of atherosclerotic lesions was observed at all incisions in control group even in atorvastatin group, whereas atherom necrotic fibres was founded at a number of them. The administration of atorvastatin were lead to significant decrease of atherosclerotic lesions compared to untreated group. There were also rapid increase of eNOS expression especially on the surface of atherosclerotic lesions.

Conclusion:

The positive influence of atorvastatin doses on eNOS expression was proved without lipid-lowering effects.

# Obsah

<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>8</b>
<b>2. MIKROSKOPICKÁ ANATOMIE CÉV.....</b>	<b>9</b>
2.1 ARTERIE .....	9
2.2 ŽÍLY.....	10
2.3 KAPILÁRY .....	11
<b>3. ATEROSKLERÓZA .....</b>	<b>12</b>
3.1 FYZIOLOGICKÉ FUNKCE JEDNOTLIVÝCH SOUČÁSTÍ INITIMY .....	13
3.1.1 Endoteliální buňky .....	13
3.1.2 Regulace permeability .....	14
3.1.3 Antitrombogenní a antiadherentní povrch.....	14
3.1.4 Udržování cévního tonu .....	14
3.1.5 Syntéza a sekrece cytokinů a růstových faktorů.....	14
3.1.6 Buňky hladké svaloviny.....	15
3.1.7 Makrofágy.....	15
3.1.8 Extracelulární matrix.....	15
3.2 PATOFYZIOLOGIE VZNIKU PLÁTU .....	15
3.3 ATEROSKLEROTICKÝ PLÁT.....	17
3.3.1 Struktura aterosklerotického plátu .....	17
3.3.2 Stabilní a nestabilní aterosklerotický plát .....	18
3.4 HLAVNÍ RIZIKOVÉ FAKTORY ATEROSKLERÓZY .....	19
3.4.1 Hypertenze .....	19
3.4.2 Kouření .....	19
3.4.3 Diabetes mellitus a porušená glukózová tolerance .....	20
3.4.4 Obezita .....	20
3.4.5 Fyzická inaktivita.....	20
3.4.6 Krevní lipidy .....	21
<b>4. PLEIOTROPNÍ ÚČINKY STATINŮ .....</b>	<b>23</b>
4.1 VLIV STATINŮ NA ENDOTELIÁLNÍ FUNKCE .....	23
4.2 VLIV STATINŮ NA ATEROSKLEROTICKÝ PLÁT.....	24
4.3 VLIV STATINŮ NA DESTIČKOVÉ FUNKCE .....	25
4.4 VLIV STATINŮ NA HEMOSTATICKÉ PARAMETRY .....	25
4.5 KLINICKÝ VÝZNAM PLEIOTROPNÍCH ÚČINKŮ STATINŮ .....	26
<b>5. OCHRANNÁ ROLE ENDOTELIÁLNÍ SYNTÁZY OXIDU DUSNATÉHO</b>	<b>28</b>
5.1 ÚVOD.....	28
5.2 FUNKCE ENOS.....	29
5.3 ROLE ENOS U NEMOCÍ.....	30
<b>6. MYŠÍ MODEL ATEROSKLERÓZY .....</b>	<b>33</b>
<b>7. CÍL PRÁCE.....</b>	<b>35</b>
<b>8. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>36</b>
8.1 ZVÍŘATA A PŘEDEPSANÁ DIETA .....	36

8.2	BIOCHEMICKÁ ANALÝZA .....	36
8.3	HISTOLOGICKÉ BARVENÍ OLEJOVOU ČERVENÍ.....	37
8.4	IMUNOHISTOCHEMIE .....	37
8.4.1	<i>Primární protilátky</i> .....	38
8.4.2	<i>Sekundární protilátky</i> .....	38
8.4.3	<i>Detekční systémy</i> .....	38
8.5	STATISTICKÁ ANALÝZA .....	40
<b>9.</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>41</b>
9.1	BIOCHEMICKÁ ANALÝZA .....	41
9.2	HISTOLOGICKÉ BARVENÍ OLEJOVOU ČERVENÍ.....	42
9.3	IMUNOHISTOCHEMICKÁ ANALÝZA .....	45
9.3.1	<i>Imunohistochemické barvení eNOS v oblasti aortálního sinu</i> .....	45
<b>10.</b>	<b>DISKUSE .....</b>	<b>49</b>
<b>11.</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>51</b>
<b>12.</b>	<b>SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>52</b>
<b>13.</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>54</b>

# 1. Úvod

Kardiovaskulární choroby jsou nejčastější příčinou úmrtí v celém vyspělém světě a není tomu jinak ani u nás. V České republice zemře na onemocnění srdce a cév ročně více než 50 tisíc lidí. Většina těchto chorob je podmíněna aterosklerózou – kornatěním tepen.

Ateroskleróza je složitý proces, který začíná okamžikem našeho narození a lze říci, že aterosklerózu má každý. Záleží ale na stupni aterosklerotického poškození cévní stěny. U osob s pokročilou aterosklerózou se objevují její pozdní komplikace – infarkt myokardu a cévní mozková příhoda, které jsou právem nejobávanějšími život ohrožujícími komplikacemi aterosklerózy (1).

Ačkoli moderní medicína umí řadu chorob srdce a cév léčit, nelze většinu z nich vyléčit. Po infarktu myokardu není srdce tak výkonné, hybnost se po mozkové mrtvici ne vždy vrací k normálu, osoby po cévních operacích mají i nadále problémy. Proto je velmi důležité ateroskleróze a jí způsobeným onemocněním předcházet (1).

Rychlost průběhu aterosklerózy závisí na přítomnosti takzvaných rizikových faktorů u každého z nás. Rizikových faktorů je velké množství a řadu z nich lze ovlivnit. Tím je možné předejít pozdním důsledkům aterosklerózy. Mezi nejdůležitější ovlivnitelné rizikové faktory aterosklerózy patří například vysoká hladina cholesterolu v krvi, vysoký krevní tlak, kouření cigaret, diabetes, nadváha i obezita a sedavý životní styl (1).

Základem léčby je snaha o ovlivnění všech rizikových faktorů. Obvykle to obnáší radikální změnu dosavadního životního stylu. Léčba aterosklerózy se zaměřuje na zastavení rozvoje tukových plátů v cévách. Nejlépe se to daří snížením koncentrace LDL cholesterolu pomocí léků, jež ovlivňují hladinu cholesterolu a působí i přímo na existující aterosklerotické pláty. Zabraňují jejich dalšímu růstu a stabilizují je. Součástí moderní léčby jsou i léky zabraňující srážení krve a vzniku trombů.



## 2. Mikroskopická anatomie cév

Stěny arterií a vén jsou tvořeny třemi vrstvami.

*Tunica intima* je relativně tenkou vrstvou vyskytující se ve všech cévách, která je v bezprostředním kontaktu s krevním proudem. Na straně přivrácené do lumen je vystlána endotelem spočívajícím na basální membráně (lamina basalis). Tato vrstvička nasedá na subendotelovou vrstvu řídkého vaziva, které může obsahovat hladké svalové buňky a dodává intimě dostatečnou pružnost při objemových změnách. Téměř všechny strukturní elementy v intimě jsou uspořádány longitudinálně (2).

*Tunica media* se skládá z cirkulárně uspořádané vrstvy s převahou hladké svaloviny a elastické složky vazivové tkáně. Vzájemný poměr obou těchto složek záleží na typu cévy. Mezibuněčná hmota je tvořena elastinem přítomným ve formě elastických vláken a elastických blanek, kolagenem III a proteoglykany. Všechny tyto komponenty jsou produkovány hladkými svalovými buňkami. Díky této vrstvě mají cévy schopnost kontrakce (zejména artérie, u nichž je tato vrstva dominantní) a odolávají krevnímu tlaku (2).

*Tunica adventitia* je vazivová vrstva připojující cévy k okolním tkáním. Je tvořena kolagenními (kolagen I) a elastickými vlákny. V některých vénách se na její stavbě podílí ještě také hladká svalovina, a tunica adventitia je v těchto případech nejtlustší vrstvou cévní stěny. U větších cév, zejména ve vénách, prochází touto vrstvou tzv. vasa vasorum, které zásobí tuto vrstvu živinami. V adventicii a v zevní třetině medie jsou uloženy pleteně vazomotorických nervů, jejichž dráždění způsobuje vazokonstrikci (2).

### 2.1 Arterie

Podle průměru dělíme arterie na arterioly, arterie malého a středního kalibru a arterie velkého kalibru.

*Arterioly* měří v průměru méně než 0,5 mm. Mají relativně úzké lumen vzhledem k tloušťce stěny. Tunica intima je tvořena vrstvou endotelových buněk a subendotelovou vrstvou. Membrána elastica se objevuje jen ve větších arteriolách.

Tunica media je složena z 1-5 vrstev hladkých svalových buněk. Membrána elastica externa není vyvinuta. Tunica adventitia je velmi tenká (3).

*Arterie malého a středního kalibru* jsou většinou arteriemi svalového typu. Vzhledem k malému průsvitu mají poměrně tlustou stěnu. Tunica intima je tvořena endotelovými buňkami, které mají stejnou strukturu jako v arteriolách. Subendotelová vrstvička je tlustší a membrana elastica interna je dobře vyvinuta. Tunica media může obsahovat až 40 vrstev hladkých svalových buněk, které jsou uspořádány do svazků a tvoří šroubovici. Mezi hladkými svalovými buňkami nacházíme různé množství elastických, retikulárních vláken (kolagen typu III) a proteoglykany. Tunica adventitia je tvořena longitudinálně uspořádanými kolagenními a elastickými vlákny. Dále nacházíme fibroblasty a adipocyty. Ve stěnách se vyskytují vasa vasorum, lymfatické kapiláry a nervová vlákna (3).

*Arterie velkého kalibru* jsou arteriemi elastického typu. Tento typ představují aorta, její velké větve a truncus pulmonalis. Stěna je tenká v poměru s velikostí lumina. Tunica intima je tlustší než v arteriích svalového typu. Subendotelová vrstva je tlustá, měří někdy až 100  $\mu\text{m}$ . Membrana elastica interna se nedá odlišit od ostatních elastických blanek v tunica media, které jsou ve stěně uspořádány koncentricky. Jejich počet se zvyšuje s věkem. Dále se zde vyskytují hladké svalové buňky, retikulární vlákna a proteoglykany. Tunica adventitia je tenká s obsahem longitudinálně uspořádaných elastických a kolagenních vláken (3).

## 2.2 Žíly

Dělíme je na venuly a na malé, střední a velké žíly.

Na *postkapilární venuly* s průměrem 50  $\mu\text{m}$  navazují *sběrací venuly* s lumenem mezi 50-100  $\mu\text{m}$ . Endotelová výstelka těchto venul je obalena kontinuální vrstvou pericytů. *Sběrací venuly* pokračují jako *muskulární venuly* s průměrem do 200  $\mu\text{m}$ . Endotelové buňky jsou obklopeny 1-2 vrstvičkami hladkých svalových buněk, které zde nahrazují pericyty.

*Venuly* mají průměr 0,2-1 mm. Tunica intima je tvořena endotelem. Tunica media je tenká, sestává z několika málo vrstev hladkých svalových buněk. Tunica

adventitia je nejtlustší vrstvou. Skládá se z longitudinálně uspořádaných kolagenních vláken.

*Malé a střední vény* měří v průměru 1-9 mm. Tunica intima je tvořena endotelem, subendotelová vrstvička je velmi tenká. Tunica media obsahuje ploché svazečky hladkých svalových buněk. Mezi nimi nacházíme retikulární vlákna a jemnou síť elastických vláken. Tunica adventitia je dobře vyvinuta. Obsahuje longitudinálně uspořádaná kolagenní vlákna. Mohou se zde vyskytnout i longitudinálně uspořádané hladké svalové buňky. Jsou vyvinuty chlopně k zabránění návratu krve (3).

Struktura stěny *velkých vén* se výrazně mění na lokalizaci v organismu. Tunica intima je většinou dobře vyvinuta s obsahem endotelu a subendotelové vrstvy tlustší než u malých vén. Můžeme zde nalézt i longitudinálně uspořádané hladké svalové buňky. Tunica media je tenká s několika vrstvičkami hladkých svalových buněk. Tunica adventitia představuje nejsilnější vrstvu stěny velkých vén. V žilách pod úrovní srdce obsahuje svazky longitudinálně uspořádaných hladkých svalových buněk. Ty zpevňují stěnu vén a zabraňují její distenzi (3).

## 2.3 Kapiláry

Stěna kapilár je tvořena jednou vrstvou endotelových buněk, které se stáčí a vytvářejí tím cylindrický prostor. Průměr kapilár je 7-9  $\mu\text{m}$ . Velmi často se větví, jejich délka kolísá mezi 0,25 a 1 mm. Endotelové buňky jsou ploché a polygonální. Pinocytotické vezikuly zajišťují mezibuněčný transport látek. Na mnohých místech se podél kapilár vyskytují pericyty. Jsou to jednotlivé buňky s dlouhými cytoplazmatickými výběžky, kterými částečně obklopují endotelové buňky. Vytvářejí vlastní bazální laminu, která může někdy splývat s bazální laminou endotelových buněk. Pericyty obsahují v cytoplazmě aktin, myozin a tropomyozin. Kolem kapilár bývá vyvinuta tenká vrstvička longitudinálně uspořádaných kolagenních vláken (3).

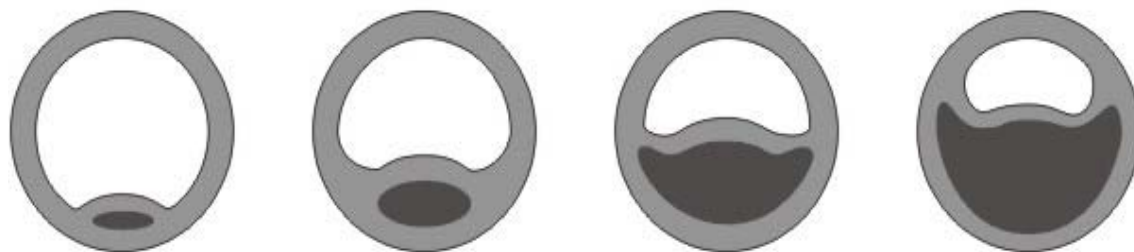
### 3. Ateroskleróza

Ateroskleróza je dlouhodobě probíhající onemocnění cévní stěny, jejíž struktura je alterována tvorbou ateromů. Onemocnění se po řadě let či desetiletí asymptomatického průběhu manifestuje svými komplikacemi: ischemickou chorobou srdeční (ICHS), ischemickou cévní mozkovou příhodou (ICMP) nebo ischemickou chorobou dolních končetin (ICHDK), méně často pak komplikacemi v jiných lokalizacích (obliterace karotid, abdominální angina a další) (4).

Aterosklerózu lze definovat jako chronické onemocnění cévní intimy provázené akumulací cholesterolu, fibrózní tkáně, některých dalších komponent krve a změnami v medii cévní stěny (viz. obr. 1) (4).

Etiopatogeneze aterosklerózy je komplexní (multifaktoriální). Vzniká jako specifická reakce na nespecifické poškození cévní stěny. Neznáme sice jednoznačnou příčinu jejího vzniku, známe však řadu faktorů, které se na jejím vzniku podílejí a které nazýváme rizikovými faktory. Podle současných znalostí jde o faktory, které poškozují cévní endotel a navozují první stadium v jejím rozvoji - endoteliální dysfunkci. Mezi těmito rizikovými faktory má dominantní postavení zvýšená koncentrace LDL cholesterolu. Je vždy základem aterosklerotického ložiska a již v roce 1913 Aničkov napsal, že „není aterosklerózy bez cholesterolu“ (4).

*Obrázek č.1: Schéma rozvoje aterosklerózy*



### 3.1 Fyziologické funkce jednotlivých součástí intimy

#### 3.1.1 Endoteliální buňky

Základní funkce endoteliálních buněk jsou regulace permeability, udržení nesmáčivého a antitrombogenního povrchu, včetně kontroly hemostázy, syntéza extracelulární matrix intimy, regulace cévního tonu a regulace remodelačních a reparačních procesů. Endoteliální buňky jsou metabolicky aktivní, produkují celou řadu působků (viz. tab.1) (5).

*Tabulka č.1: Významné faktory tvořené v endoteliálních buňkách*

<b>vazodilatační</b>	<b>vazokonstrikční</b>
oxid dusnatý (EDRF)	endotelin
prostacyklin	tromboxan A <sub>2</sub>
EDHP	prostaglandin H <sub>2</sub>
typ C natriuretického peptidu	
<b>antitrombotické</b>	<b>protrombotické</b>
TPA	PAI-1
<b>inhibitory růstu</b>	<b>prorůstové</b>
oxid dusnatý	endotelin
prostacyklin	angiotensin II
typ C natriuretického peptidu	superoxidový radikál
<b>protizánětlivé</b>	<b>prozánětlivé</b>
oxid dusnatý	TNF-α
	superoxidový radikál

### **3.1.2 Regulace permeability**

Přes zdravý endotel přechází nejen voda, ionty a živiny, ale i makromolekuly jako bílkoviny krevní plazmy, lipoproteiny a také některé buňky. Transportovány jsou řadou mechanismů: transcytózou, pomocí vezikul, paracelulárních kanálků a mezibuněčných spojů atd. (6). Rychlost transportu je závislá na plazmatické koncentraci, velikosti a náboji molekul, ale také na krevním tlaku, věku a dalších faktorech. Endoteliální buňky mají na svém povrchu také receptory pro LDL cholesterol, histamin a inzulin a nespecifická vazebná místa pro některé hormony a léky.

### **3.1.3 Antitrombogenní a antiadherentní povrch**

Membrána endoteliálních buněk obsahuje trombomodulin, který váže trombin a mění ho na aktivátor proteinu C (aktivovaný protein C inaktivuje faktory Va a VIIIa, a působí tak proti tvorbě trombu). Endoteliální buňky syntetizují glykosaminoglykany, které inaktivují faktor X a trombin, a aktivátor plazminogenu. Na funkční endotel neadherují trombocyty ani leukocyty, dokonale nesmáčivý povrch zajišťuje kromě negativního elektrostatického náboje i sekrece oxidu dusnatého a prostacyklinu (inhibuje agregaci trombocytů) (7).

### **3.1.4 Udržování cévního tonu**

Optimální cévní tonus je udržován syntézou vazodilatačních a vazokonstrikčních působků. Vazodilatačně působí oxid dusnatý (NO), prostacyklin, endotelem odvozený hyperpolarizační faktor (EDHF) a typ C natriuretického peptidu. NO působí vazodilataci aktivací guanylátcyklázy svalových buněk. Vazokonstrikční látkou syntetizovanou v endotelu je především endotelin, tromboxan A<sub>2</sub> a prostaglandin H<sub>2</sub> (8).

### **3.1.5 Syntéza a sekrece cytokinů a růstových faktorů**

V průběhu prvního stadia rozvoje aterosklerózy při endoteliální dysfunkci syntetizují endoteliální buňky dále řadu působků, které modifikují další progresi

aterosklerotické léze: cytokiny, chemotaktické a růstové faktory pro monocyty, CSF pro makrofágy a další (9).

### **3.1.6 Buňky hladké svaloviny**

Funkce hladkých svalových buněk ve zdravé intimě není zcela jasná. Vznikají jak z endoteliálních buněk, tak ze svalových buněk medie. Dalšími funkcemi jsou syntéza extracelulární matrix intimy, která se může uplatňovat v rozvoji aterosklerózy a také restenózy po angioplastice. Na svém povrchu exprimují receptory růstových faktorů, které stimulují proliferaci. Dále mají na svém povrchu LDL receptory, kterými získávají pro svoji potřebu cholesterol. Během aterogeneze mohou být tyto jejich funkce vystupňovány a akumulací lipidů se mohou přeměnit na pěnové buňky (10).

### **3.1.7 Makrofágy**

Zdravá intima obsahuje jen velmi málo makrofágů, jejich počet ale vzrůstá při jejím zesílení a během aterogeneze. Hlavní funkce makrofágů v intimě je remodelace intimy. Tu ovlivňuje syntéza proteináz (metaloproteináz, kolagenáz, elastáz) a syntéza růstových faktorů pro endoteliální a hladké svalové buňky (11). Makrofágy reagují na zánět, včetně scavengerové funkce. Zajišťují imunitní odpověď, vazbu a prezentaci antigenů, produkci cytokinů a růstových faktorů jako součást odpovědi na zánět.

### **3.1.8 Extracelulární matrix**

Extracelulární matrix je především strukturální složkou intimy. Její další funkce jsou zajištění fyziologické permeability cévní stěny, regulace buněčné proliferace.

## **3.2 Patofyziologie vzniku plátu**

Růst aterosklerotického plátu lze rozdělit do 5 fází a příslušných typů lézí (12).

Ve *fázi 1* dochází růstem tukových proužků k vzniku ateromu během prvních 30 let života jedince. Příčinnou je vychytávání a modifikace plazmatických LDL skrz poškozený nebo dysfunkční endotel (12).

HDL transportuje LDL zpět do krevního proudu za pomoci nosiče apolipoproteinu A-1. Vychytávání LDL z plazmy se děje prostřednictvím cholesteryl ester transfer proteinu (CETP) a lecitin cholesterol acyltransferázy (LCAT). Tím je esterifikován cholesterol a dochází k výměně esterů za triglyceridy. Oxidované LDL (oxLDL) stimulují produkci 2 Adhezivní glykoproteiny endoteliálních buněk (ICAM – intracelulární adhezni molekula a VCAM – adhezni molekula cévních buněk), které přitahují monocyty (12).

V cévní stěně se monocyty mění na makrofágy za účasti specifických látek, jako je např. monocyty kolonie stimulující faktor (M-CSF) nebo monocyty přitahující protein (MCP-1). Vysoce oxLDL vstupuje do jejich nitra a přeměňuje je na pěnové buňky, které jsou základem lézí typu 1. (12)

K dalšímu poškození endotelu dochází po smrti makrofágů nebo pěnových buněk uvolněním volných radikálů, oxLDL a dalších produktů. Na poškozený endotelový povrch působí růstový faktor z krevních destiček (PDGF), který stimuluje proliferaci buněk hladkého svalu a syntézu extracelulární matrix. Vznikají tak léze typu 2. (12)

Léze typu 3 navíc kumuluje fibrily, lipidová depozita a extracelulární vazivovou tkáň. Tyto časně aterosklerotické léze představují dynamický stav vstupu a výstupu LDL a tvorby extracelulární matrix. Endotel má při poškození tendenci ke zvýšené produkci vazokonstrikčního faktoru endotelinu-1, ačkoliv za normální situace produkuje v rovnováze jak vazokonstrikční faktory (endotelin-1), tak relaxační látky (NO, prostacyklin). Pokles vstupu LDL do buněk má za následek převahu výstupu LDL, což umožňuje zajizvení léze. Naopak převaha vstupu LDL do endotelu může vyústit v tvorbu nestabilního plátu bohatého na lipidy (12).

*Fáze 2* je představována lézemi typu 4 a 5a tvořenými výše zmíněnými nestabilními pláty bohatými na lipidy. Jsou velmi rizikové a náchylné k ruptuře. Pacienti jsou asymptomatictí a pláty se při koronarografii nezobrazují. Léze typu 5a tvoří extracelulární lipidové jádro pokryté tenkou fibrózní čepičkou. Ruptura těchto plátů způsobuje 2/3 všech akutních koronárních syndromů (AKS). Může se také vyvinout do syndromu anginy pectoris (AP) či do fibrtické fáze aterosklerózy (12).



*Fáze 3 a 4* představují progresi z fáze 2 disrupcí nebo erozí plátu, který je označován jako akutní komplikovaná léze typu 6. Skládá se z buněčných lézí s extracelulárními depozity lipidů a namíchanou vazivovou tkání. Ve třetí fázi dochází k tvorbě murálního trombu, který neuzavírá arterii úplně. Nebo nastává čtvrtá fáze charakterizovaná úplnou obliterací průsvitu arterie, která vyústí v AKS. Fáze 3 může být klinicky němá a díky procesu hojení, remodelace a dalších subklinických trombóz může vést ke stenóze arterie (12).

Ve *Fázi 5* probíhají změny v geometrii prasklého plátu a přeměňuje se buď v plát kalcifikovaný (léze typu 5b) nebo fibrotický (typ 5c). Tyto léze mohou způsobit AP, IM, nebo se mohou němě uzavřít, pokud vedla preexistující stenóza a ischemie k rozvoji kolaterálního řečiště (12).

### **3.3 Aterosklerotický plát**

#### **3.3.1 Struktura aterosklerotického plátu**

Aterosklerotický plát sestává z lipidového protrombogenního jádra, pokrytého směrem k cévnímu lumen fibrózním krytem. Ten odděluje lipidové jádro od endotelu a cévního lumen. Fibrózní kryt obsahuje hladké svalové buňky a zánětlivé buňky, především makrofágy. Aktivita makrofágů je udržována především ingescí oxLDL cestou scavengerových receptorů a takto aktivované makrofágy produkují cytokiny a růstové faktory. Ty přitahují do intimy hladké svalové buňky, které jako jediné mohou syntetizovat kolagenní matrix a vytvářet fibrózní kryt plátu, který izoluje jeho trombogenní lipidové jádro od cirkulující krve. Aktivované makrofágy naopak produkují enzymy, degradující fibrózní kryt (13).

Typický zralý aterosklerotický plát sestává ze dvou hlavních komponent, měkkého jádra bohatého na lipidy a tvrdé, kolagenem bohaté sklerotické tkáně, která odděluje lipidové jádro od endoteliálních buněk. Obě složky mají u různých plátů různé zastoupení (14).

### 3.3.2 Stabilní a nestabilní aterosklerotický plát

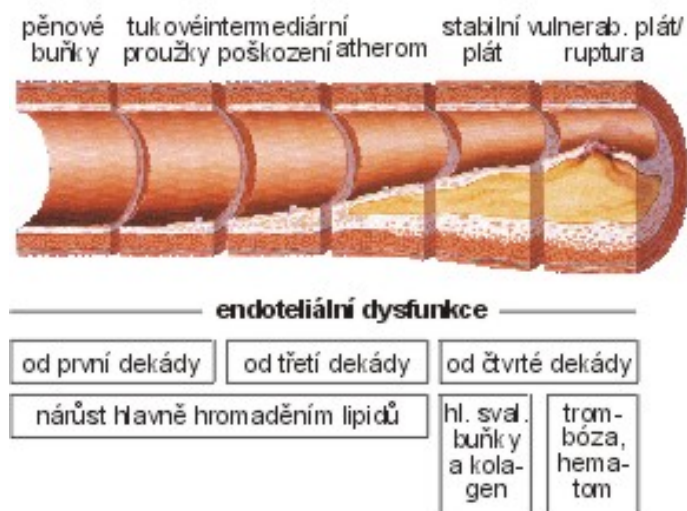
Pokud se aterosklerotický plát vyklenuje do cévního lumen, může to mít hemodynamické důsledky pro průtok krve za stenózou (viz. obr. 2). Omezení průtoku je dáno jednak velikostí stenózy, jednak přítomností spasmů. Takovýto aterosklerotický plát se může manifestovat ischemickými příznaky, tedy typickou stabilní AP nebo klaudikačními potížemi. Tento typ plátu většinou neohrožuje pacienta na životě akutní koronární příhodou, pouze asi 14 % koronárních příhod je způsobeno lézí, která obturuje > 70 % průsvitu arterie (15).

Naprostá většina akutních koronárních příhod má příčinu v trombóze, která nasedá na hemodynamicky nevýznamný plát, který má slabý fibrózní kryt a u kterého může dojít k obnažení subendoteliálních prostor a tím ke spuštění koagulační kaskády. Nejčastěji dochází k ruptuře plátu s nasedající nástěnnou trombózou a klinickým obrazem AKS. Takovýto plát, náchylný k ruptuře, se nazývá plát vulnerabilní nebo nestabilní. O stabilitě plátu nerozhoduje jeho velikost, ale jeho složení (16).

*Stabilní plát* obsahuje větší množství hladkých svalových buněk a velké množství kolagenu ve fibrózní čepičce plátu, malé lipidové jádro a malé množství zánětlivých buněk (makrofágy, lymfocyty). Fibrózní čepička (kryt) je poměrně silná a neporušená, tvořená kolagenními a elastickými vlákny a hladkou svalovinou, její povrch je tuhý. Stabilní pláty bývají pláty starší, jsou často hemodynamicky významné, jsou ale po řadu let stálé (17).

*Vulnerabilní (nestabilní) plát* bývá měkký, mívá velké lipidové polotekuté jádro, složené převážně z esterů cholesterolu, pěnových buněk a T-lymfocytů. Obsahuje velké množství zánětlivých buněk, tenký fibrózní kryt s malým množstvím kolagenu a málo hladkých svalových buněk. Ačkoliv nestabilní pláty tvoří jen malou část aterosklerotických plátů v koronárních arteriích, jsou zodpovědné za většinu akutních koronárních syndromů. Nestabilní bývají pláty „mladé“, hemodynamicky nevýznamné a nezjistitelné při angiografickém vyšetření (17).

Obrázek č.2: Tvorba aterosklerotického plátu (1)



### 3.4 Hlavní rizikové faktory aterosklerózy

#### 3.4.1 Hypertenze

U mužů středního věku s TK nad 160/95 mm Hg je riziko aterosklerotických komplikací 5× vyšší než u normotenzních osob. Ve věku nad 50 let může mít hypertenze pro rozvoj aterosklerózy větší prediktivní význam než hypercholesterolemie. Zvýšení systolického krevního tlaku je významnějším rizikovým faktorem než zvýšení diastolického krevního tlaku. Cílové hodnoty krevního tlaku jsou < 140/90 mm Hg, u diabetiků < 130/85 mm Hg. Léčba hypertenze snižuje především incidenci cévních mozkových příhod, ICHS a srdečního selhání (9).

#### 3.4.2 Kouření

Je jedním z nejrozšířenějších rizikových faktorů, sdružených s rizikem aterosklerózy. Mechanismem účinku kouření je nejen indukce endoteliální dysfunkce, ale i rozvoj dyslipidemie (nízký HDL cholesterol, více oxidovaných LDL), hemodynamický stres (tachykardie, přechodný vzestup TK), zvýšení koagulační pohotovosti, vyšší arytmogenní pohotovost a relativní hypoxie (CO redukuje kapacitu Hb pro kyslík). Snižuje se tolerance k fyzické zátěži. Ve srovnání s nekuřáky je

u kuřáků jedné krabičky/den zvýšeno riziko ICHS asi 3-5× a riziko náhlého úmrtí asi o 70 % (18).

### **3.4.3 Diabetes mellitus a porušená glukózová tolerance**

Diabetická makroangiopatie postihuje všechny predilekční lokalizace aterosklerózy: koronární i cerebrální a arterie dolních končetin. Riziko ICHS je u diabetiků 2-4× vyšší než u nediabetické populace (u mužů 2×, u žen 4× vyšší) Cévní mozkové příhody jsou u diabetiků asi 3× častější, 80 % diabetiků umírá na komplikace aterosklerózy. Prognóza diabetika, který prodělal IM, je horší než prognóza nediabetika a diabetici mají ve srovnání s nediabetiky zhoršené přežívání po revaskularizačních zákrocích. Vysoké riziko u diabetiků není dáno jen vlivem hyperglykemie (glykace) na lipoproteiny a na cévní endotel, ale také vysokým současným výskytem hypertenze, dyslipidemie a obezity (19).

### **3.4.4 Obezita**

Se stoupajícím BMI se zvyšuje kardiovaskulární i celková mortalita. Vzestup mortality je dán především vzestupem ICHS, CMP, ale také nádorových a dalších onemocnění. Při vzestupu váhy o 20 % nad normu se signifikantně zvyšuje výskyt ICHS (20). Ve Framinghamské studii měl BMI nezávislý vliv na riziko ICHS, tento efekt byl dále násoben kumulací dalších rizikových faktorů: vzestup hmotnosti o 10 % vedl k vzestupu TK o 6,5 mm Hg, cholesterolu o 0,3 mmol/l a lačné glykemie o 0,1 mmol/l. Obezita akceleruje aterosklerózu především u osob pod 50 let věku (21).

### **3.4.5 Fyzická inaktivita**

Některé studie prokázaly, že pravidelná fyzická aktivita snižuje riziko ICHS, kardiovaskulární i celkové mortality u mužů i u žen. Musí to však být součástí celkové sekundární prevence. Riziko ICHS u mužů se sedavým způsobem života je asi 2× větší než u mužů s pravidelnou fyzickou aktivitou. U nemocných s ICHS, kteří po hospitalizaci začali s pravidelnou fyzickou aktivitou, došlo k poklesu kardiovaskulární i celkové mortality ve srovnání s těmi, kteří nezměnili svůj životní styl. Statisticky významný rozdíl byl patrný po 1-3 letech (22).

### 3.4.6 Krevní lipidy

O významu zvýšeného LDL cholesterolu jako samostatného rizikového faktoru není pochyb. Snížení jeho koncentrace o 1 % vede k poklesu rizika koronárních příhod o asi 2 %. Není zatím jasné, jaké jsou optimální koncentrace LDL cholesterolu v krvi. Současná doporučená koncentrace  $< 3 \text{ mmol/l}$  je doporučena pro primární i sekundární prevenci ICHS. Intervenční studie ale ukazují, že i další pokles LDL cholesterolu pod tuto hranici a dokonce i pod  $2,5 \text{ mmol/l}$  dále redukuje riziko koronárních příhod (23).

Nízká koncentrace HDL cholesterolu je samostatným nezávislým rizikovým faktorem předčasné ICHS a kardiovaskulárních příhod. Naopak, jeho vysoká koncentrace eliminuje riziko zvýšeného LDL cholesterolu. Zvýšení HDL cholesterolu o 1 % snižuje riziko koronárních příhod o 2-3 %. Žádoucí koncentrace HDL cholesterolu je  $> 1,0 \text{ mmol/l}$  (23).

Zvýšená koncentrace triglyceridů (TG) je také samostatným nezávislým rizikovým faktorem ICHS u žen i u mužů, vyšší riziko ale přináší ženám. Metaanalýza 22 studií prokázala, že zvýšení koncentrace TG o  $1 \text{ mmol/l}$  zvyšuje riziko koronární příhody o 15 % u mužů a o 37 % u žen. Mechanizmů, kterými TG zvyšují riziko aterosklerózy, je více, především ale jsou indikátorem přítomnosti lipoproteinů, které mohou přestupovat přes cévní endotel (24).

Lipoprotein(a) (Lp(a)) je svojí strukturou velmi podobný LDL, ale není katabolizován cestou LDL receptorů. Na svém povrchu má navázán další glykoprotein - apolipoprotein(a), který je strukturálně homologní s plazminogenem. Soutěží s ním o vazbu na plazmin, ale protože plazmin neaktivuje, potlačuje fibrinolýzu. Zvýšená koncentrace Lp(a) zvyšuje riziko uzávěru arterie trombem a je rizikovým faktorem vzniku koronárních příhod (25). Zvyšuje ale také riziko ICHDK a CMP.

C-reaktivní protein (CRP) je nezávislý na jiných rizikových faktorech, a to i v oblasti velmi nízkých hodnot. Je to protein akutní fáze tvořený v játrech pod vlivem IL-6. IL-6 je syntetizován v aktivovaném monocytu, CRP je tedy nespecifickým ukazatelem zánětlivého procesu. Je prokázáno, že zvýšený CRP předpovídá riziko anginy pectoris, koreluje s koronarografickým nálezem na koronárních arteriích

a nemocní po IM mají hladinu CRP vyšší než ti, kteří ICHS nemají (26). Vysoká koncentrace CRP zvyšuje riziko nejen IM, ale i CMP.

Není zatím jasné, zda je zvýšení CRP indukováno probíhajícím zánětem v cévní stěně nebo jiným zánětlivým procesem v organismu, který aktivuje současně i proces aterosklerózy. Další hypotézou je, že CRP má sám o sobě přímý vliv na proces aterosklerózy, kterou aktivuje.

Sérový amyloid A (SAA), ceruloplazmin a feritin mají podobný význam jako CRP, jsou to reaktanty zánětlivého procesu (27).

Fibrinogen má dvojí vztah k riziku aterosklerózy a jejích komplikací. Je zánětlivým reaktantem, tedy může být zvýšen ze stejného důvodu jako CRP. Jeho zvýšená hladina může přispívat ke zvýšené koagulační pohotovosti a tím ke zvýšenému riziku vzniku trombózy (9).

## 4. Pleiotropní účinky statinů

Statiny jsou v dnešní době považovány za nejúčinnější hypocholesterolemika. Jsou to účinné kompetitivní inhibitory klíčového enzymu v biosyntéze cholesterolu hydroxy-metylglutaryl-koenzym A reduktázy (HMG-CoA). Používají se jako lék první volby u většiny typů hyperlipidemií. Jejich efekt byl prověřen jak v primárně, tak v sekundárně preventivních studiích. Dokumentován byl pokles mortality i morbidity. Metaanalýza řady studií ukázala, že pokles LDL cholesterolu o 25–35 % po podání statinů je následován 24–37 % poklesem kardiovaskulární úmrtnosti, resp. pokles LDL cholesterolu o jeden mmol/l vede ke 24 % poklesu kardiovaskulární mortality (28).

Na účinku statinů se podílí pokles LDL cholesterolu, který se pohybuje podle dávky a užitého statinu od 20 do 60 %, pokles hladiny triacylglycerolu o 10–30 % a vzestup HDL cholesterolu o 6–12 %. Mechanismus efektu je dán bloádou HMG-CoA reduktázy, klíčového enzymu uplatňujícím se v časně fázi steroidogeneze. Snížení syntézy a tedy i koncentrace cholesterolu v hepatocytu vede k transkripci genu pro receptory LDL. Zvýšení exprese těchto jaterních receptorů, které vychytávají LDL cholesterol z plazmy přímo sníží hladinu těchto aterogenních lipidů. Současně jsou aktivovány další geny zapojené do kontroly metabolismu cholesterolu, mastných kyselin a triacylglycerolů, které zprostředkují výše zmíněný efekt na non-LDL lipidy (29).

Jednotlivé statiny se liší relativní účinností a tzv. nelipidovým působením, tzn. antiagregačním, antiproliferativním účinkem, vlivem na úpravu endoteliálních funkcí, stabilizaci ateromatózních plátů aj. (30).

### 4.1 Vliv statinů na endoteliální funkce

Endotel hraje klíčovou roli v kontrole homeostázy hemostatických procesů v krevním oběhu. Dysfunkce endotelu může vyústit v protrombogenní a prokoagulační stav, který může vést k akutní trombotické komplikaci aterosklerózy. Hypercholesterolemie, stejně jako jiné kardiovaskulární rizikové faktory, vede díky endoteliální dysfunkci např. ke zvýšené tvorbě superoxidového aniontu a k redukci

syntézy NO endoteliálními buňkami. Další poruchou, způsobenou hyperlipoproteinemií, je zvýšená exprese adhezních molekul. Tyto molekuly zajišťují adhezi a infiltraci monocytů do cévní stěny, a tak zahajují proces aterosklerózy (31).

Bylo prokázáno, že intervence snižující hladinu lipidů v séru funkci endotelu zlepšují. Pokusy byly prováděny jak na experimentálních modelech, tak i u pacientů s hyperlipoproteinemií. Zlepšení endoteliálních funkcí po léčbě hypolipidemizujícími léky je pak jedním z mechanismů účinku léčby. Zvýšení vazodilatace závislé na látkách produkovaných endotelem bylo prokázáno po krátkodobé i dlouhodobé terapii statiny.

Kromě toho bylo dokázáno, že rychlé snížení hladiny cholesterolu LDL-aferézou zlepšuje funkce endotelu již během hodin. To potvrzuje fakt, že jedním z hlavních mechanismů příznivého účinku statinů je v tomto případě přímé snížení hladiny LDL cholesterolu. Z pokusů dále vyplývá, že snížení hladiny LDL cholesterolu zlepšuje funkci endotelu v cévách (ať už s aterosklerózou nebo bez ní) a činí tak během krátké doby (32). Nicméně ve studiích pravastatinu, byl endoteliální přínos prokázán nezávisle na snížení LDL.

## **4.2 Vliv statinů na aterosklerotický plát**

Náhlá eroze aterosklerotického plátu vede k vytvoření trombu a je spojena s propuknutím akutní kardiovaskulární příhody. Ruptura plátu usnadní interakci mezi krevním tokem a hlubšími komponenty léze, jakým je např. tkáňový faktor. Trombogenicita porušeného aterosklerotického plátu je modulována obsahem tkáňového faktoru. Specifická inhibice tkáňového faktoru může trombogenicitu výrazně redukovat.

Aikawa et al. prokázali, že cerivastatin snižuje růst makrofágů exprimující matrixovou metaloproteinázu MMP-1,2,9 a tkáňového faktoru u hyperlipidemických králíků. Dále prokázali nárůst obsahu kolagenu v plátech králíků léčených cerivastatinem. Tato zjištění vedla k závěru, že cerivastatin vede ke stabilizaci plátu (33).

V novější studii byl měřen efekt terapie simvastatinem u asymptomatických neléčených pacientů s hypercholesterolemií a aterosklerózou karotid a aorty. Pláty byly



hodnoceny pomocí MRI v různé době od zahájení terapie. Byla zjištěna signifikantní regrese plátu. Oproti brzkému efektu statinů na hladinu lipidů bylo však pro pozorování změn ve stěně cévy potřeba minimálně 12 měsíců (34).

### **4.3 Vliv statinů na destičkové funkce**

Krevní destičky hrají stěžejní roli v aterogenezi a v patofyziologii akutních trombotických příhod. Hypercholesterolemie je spojena se zvýšenou destičkovou aktivitou.

Některé studie nedávno prokázaly snížení destičkové aktivity po léčbě statiny. Snížení trombogenicity bylo prokázáno u simvastatinu a pravastatinu. Navíc bylo prokázáno, že antitrombotický efekt je přítomen jak u lidí s kardiovaskulárními chorobami, tak i bez nich (35).

### **4.4 Vliv statinů na hemostatické parametry**

Vysoké hladiny sérových lipidů jsou spojeny s hyperkoagulačním stavem, definovaným změnou v některých hemostatických faktorech a zvýšením hladin molekulárních markerů aktivace koagulace plazmy. OxLDL cholesterol zvyšuje expresi tkáňového faktoru na lidských monocyttech. Tkáňový faktor pak iniciuje zevní cestu koagulace aktivací faktoru VII. Simvastatin způsobuje snížení exprese tkáňového faktoru na těchto buňkách u pacientů s hypercholesterolemií.

Zvýšená exprese tkáňového faktoru na monocyttech byla studií zjištěna u hypercholesterolemických pacientů. K signifikantnímu snížení aktivity tkáňového faktoru došlo po léčbě cerivastatinem jak u hypercholesterolemických pacientů, tak i u lidí s normální hladinou cholesterolu (36).

Přidáním simvastatinu do buňky hladké svaloviny cévy a do endoteliálních buněk, tyto buňky reagují snížením uvolňování inhibitorů aktivátoru plazminogenu (PAI-1). Endoteliální buňka dále reaguje zvýšením uvolňování tkáňového aktivovaného plazminogenu (tPA).

V další studii byla sledována léčba atorvastatinem u hyperlipidemických pacientů. Způsobí signifikantní redukci aktivity faktoru VII v případě, že je hladina

LDL cholesterolu snížena pod doporučené hladiny pro primární prevenci aterosklerózy (37).

#### **4.5 Klinický význam pleiotropních účinků statinů**

Možná role protizánětlivých účinků statinů byla prokázána ve studii Cholesterol And Recurrent Events, ve které byl pravastatin nejvíce prospěšný u pacientů s více než 90 % hladinou C-reaktivního proteinu na začátku studie. Na druhou stranu, hladiny C-reaktivního proteinu se zvýšily u těch, kteří přežili IM v průběhu 5-leté studie. Snížené hladiny C-reaktivního proteinu byly také zaznamenány u ostatních statinů, včetně atorvastatinu a simvastatinu.

Nelipidové účinky statinů nemusí být omezeny na oslabení aterogeneze. V in vitro pokusech mají statiny vliv na mnoho různých buněk, včetně inhibice osteoklastů a proliferace nádorových buněk. Tato pozorování vedla k nyní probíhající experimentální studii statinů jako antiosteoporotického a protinádorového faktoru (38).

Dále se ukazuje, že ubiquinon (enzym Q-10), antioxidant, jehož syntéza je inhibována statiny, by mohl přispět k odolnosti vůči oxidaci LDL a to jak v plazmě, tak v tkáni. Interakce s produkcí ubiquinonu vede ke snížení antioxidační aktivity za fyziologických podmínek (39).

Silné antiaterogenní účinky prokázané buď in vitro, nebo nepřímo, in vivo, se nemusí nutně přenést v klinický přínos. U estrogenů, jež mají mnohem slabší účinky snížení LDL než statiny, bylo dokázáno, že mají významné příznivé účinky na cévní reaktivitu, oxidaci LDL, absorpci LDL makrofágy a další aterogenní procesy.

V nedávné klinické studii Heart Estrogen-progestin Replacement Study však nebyl prokázán žádný užitek u žen v menopauze s opakujícími srdečními příhodami s předchozí diagnózou ICHS v průběhu 4-leté studie (40). Nicméně tento výsledek může být způsoben souběžným podáváním medroxyprogesteronu. V nově přednesené angiografické studii (testování s nebo bez medroxyprogesteronu), nebyl prokázán efekt na koronární regresi (41).

Tyto studie by měly posloužit jako správná připomínka, že účinek prokázaný in vitro nebo v menších in vivo studiích nemusí mít prokazatelně klinický význam.

Studie primární prevence ICHS s hormonální substituční léčbou nebyly provedeny, takže neexistuje žádný konkrétní důkaz na podporu tohoto přístupu.

Pokud jde o současné užívání statinů v prevenci aterosklerotických příhod, nelipidové pleiotropní účinky těchto léků jsou zajímavé, ale ne moc nápomocné. Neexistují dostatečné údaje k prokázání reprodukovatelných rozdílů mezi dostupnými statiny a je velmi málo důkazů o tom, že výběr určitého statinu na základě těchto pleiotropních vlastností by měl jakýkoliv klinický význam pro pacienta. Také nejsou k dispozici žádné údaje, které odůvodňují užívání statinů u pacientů s nízkou až normální hladinou LDL cholesterolu pouze na základě jejich pleiotropních účinků (42).

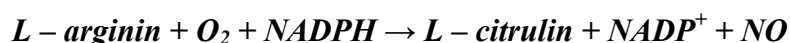
V současné době zůstávají pleiotropní účinky fascinující sadou vlastností bez většího přímého klinického významu.

## 5. Ochranná role endoteliální syntázy oxidu dusnatého

### 5.1 Úvod

Oxid dusnatý je multifunkční faktor, který slouží jako klíčová signální molekula ve fyziologických procesech jako je obranyschopnost, neuronální komunikace a regulace cévního tonu. Přestože NO je nezbytná molekula, jeho tvorba není vždy prospěšná, nadbytek nebo nedostatek produkce NO může mít škodlivé účinky na (pato) fyziologické procesy.

NO je produkován z terminálního guanidino dusíku L-argininu přes NG-hydroxy-L-arginin a meziprodukt L-citrulin, reakcí katalyzovanou syntásou oxidu dusnatého (NOS) (43).



Existují tři různé izoformy syntázy oxidu dusnatého, které můžeme rozdělit do 2 funkčních tříd. První skupina je základní třída, do které patří endoteliální NOS (eNOS) a neuronální NOS (nNOS). Tyto  $Ca^{2+}$  / kalmodulin-dependentní enzymy produkují NO v krátkých intervalech v nízkých koncentracích (nM) pro fyziologické účely. Druhá třída je tvořena inducibilní formou NOS (iNOS), která produkuje NO ve vyšších koncentracích (μM) po dobu aktivace enzymu. Přestože iNOS je podstatně přítomný v některých tkáních, např. v epitelu plic a distálních tubulech v ledvinách, exprese je především zánětlivými buňkami po indukci cytokiny a dalšími zánětlivými mediátory. Její činnost je nezávislá na  $Ca^{2+}$  (44).

Je potvrzeno, že tvorba NO prostřednictvím iNOS ve velkém množství je toxickým poškozujícím faktorem. Na druhou stranu je eNOS viděna jako ochranný enzym. Z tohoto důvodu se v současné době zaměřuje mnoho úsilí na pochopení role NO a jeho syntáz v patogenezi různých nemocí (45).

## 5.2 Funkce eNOS

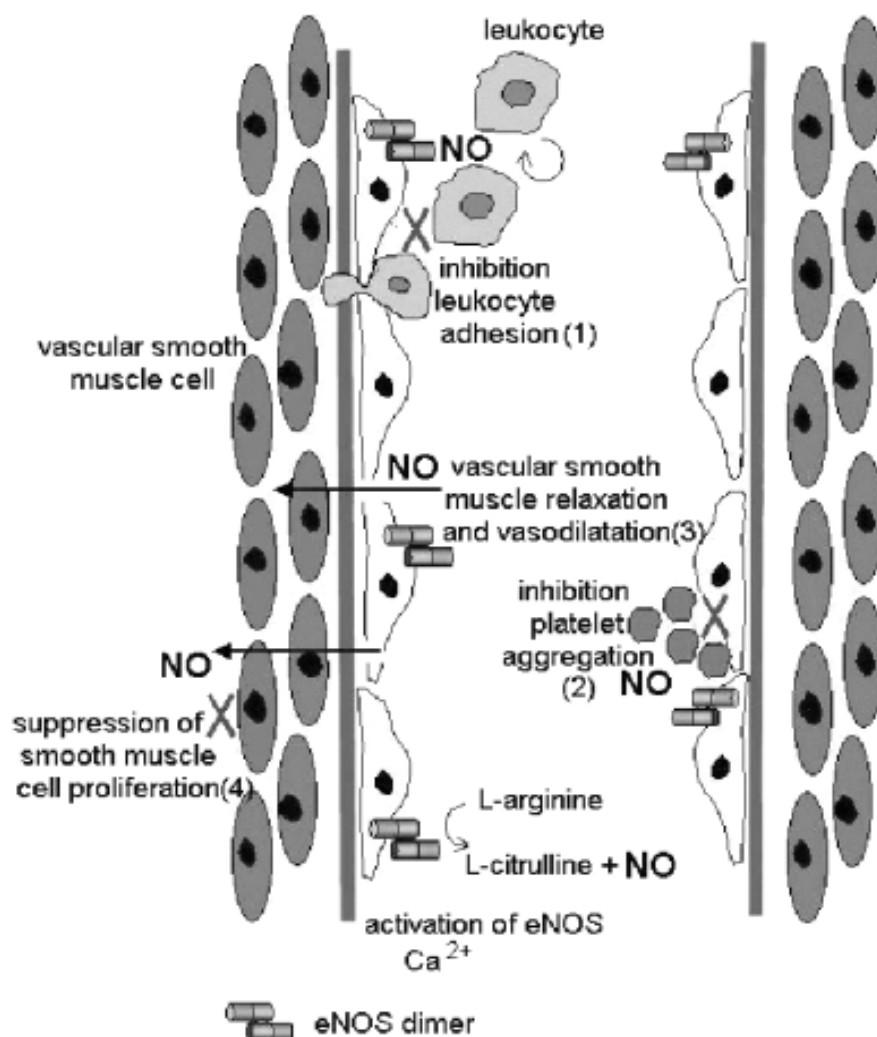
Enzym eNOS se tvoří v endoteliálních buňkách, krevních destičkách, buňkách hladké svaloviny, srdečních myocytech, kostních buňkách a v neuronech. Endoteliální NO může reagovat s širokou paletou molekul. NO radikály se rychle šíří a působí na okolní buňky vazbou k hemové části rozpustné guanylyl cyclázy, která při aktivaci zvyšuje hladiny cGMP, což vede k aktivaci dalších kaskád. V buňkách hladké svaloviny cév bude mít aktivace guanylyl cyclázy za následek relaxaci.

NO může také přímo aktivovat vápník-dependentní draslíkové kanály, vedoucí k endotel-dependentní hyperpolarizaci buněk hladké svaloviny cév, což způsobuje vazodilataci. Nicméně, ne všechny endotel-dependentní relaxace lze vysvětlit buď uvolněním NO nebo prostacyklinu. Buňky hladké svaloviny cév mohou také relaxovat při reakci s endotel-dependentním hyperpolarizačním faktorem (EDHF), který je považován za alternativní cestu v oblasti kontroly cévního tonu (46) (viz. obr. 3).

Účinky NO tvořeného eNOS jsou všestranné. Kromě regulace cévního tonu, NO reguluje adhezi leukocytů k endotelu, inhibuje proliferaci buněk hladké svaloviny cév, agregaci krevních destiček, reguluje kostní hmotu a její přeměnu, ledvinnou spotřebu kyslíku a angiogenezi. Tyto všestranné funkce dávají endoteliálnímu NO nesmírný vliv na cévní funkce a integritu.

Dosud byly patologické účinky změněné produkce eNOS a biodostupnost spojeny s hypertenzí, hypercholesterolémií, aterosklerózou, diabetem, selháním srdce a špatným hojením ran (47). Studie lidských nemocí se zaměřily především na projevy enzymu během patogeneze a na účinek intervence při podání donorů NO. U experimentálních modelů je studována role eNOS ovládním jeho exprese a aktivity pomocí NOS inhibitorů, jako je methylester L-nitro-argininu (L-NAME) a L-nitro-monomethyl arginin (L-NMMA) nebo knockout myši (48).

Obrázek č.3: Funkce eNOS ve vaskulárním systému



### 5.3 Role eNOS u nemocí

Role eNOS byla u onemocnění zkoumána jak u člověka, tak u laboratorních zvířat. Studie eNOS deficientních ( $\text{eNOS}^{-/-}$ ) modelů a inhibice eNOS prokázaly, že změněná exprese a aktivita eNOS mění endoteliální integritu a funkce, které vedou k patologickým jevům. U těchto chorobných stavů není vždy známo, který faktor zahájil aberantní expresi a aktivitu eNOS. Může to být způsobeno hypoxií, stresem, hormony nebo polymorfismem genů. Příčina může být také v souvislosti s primárním poškozením endotelu (49).

Dá se tedy jen spekulovat, zda je endoteliální dysfunkce způsobena změnou aktivitou eNOS či jinou příčinou. Ať tak či onak, endoteliální dysfunkce, kterou je změněná aktivita eNOS součástí, je důležitým spolufaktorem k manifestaci a progresi nemoci.

Poruchy aktivity a endoteliální dysfunkce eNOS jsou pozorovány u různých lidí a experimentálních onemocnění včetně hypertenze, hypercholesterolémie a aterosklerózy.

U hypertenzních pacientů, L-NAME infuze způsobují významně nižší vazokonstrikci než u normotenzních regulací, což naznačuje zhoršenou bazální produkci NO. Toto zhoršení endotel-dependentní vazodilatace je zřejmé i u lidí s hypercholesterolémií, aterosklerózou a srdečním selháním. V ostatních cévních systémech, jako jsou plíce, mohou vést poruchy aktivity eNOS také k deregulaci cévního tonu a může vyústit v plicní hypertenzi (50).

Agregace krevních destiček, přilnavost leukocytů a proliferace buněk hladkého svalstva přispívá ke vzniku a progresi aterosklerotických lézí. Endoteliální NO ovlivňuje tyto procesy, a proto může být ochranou proti ateroskleróze.

Skutečně na eNOS<sup>-/-</sup> myším experimentálním modelu aterosklerózy byl prokázán zvýšený krevní tlak a zvýšená velikost aterosklerotických lézí. Ateroskleróza je charakterizována jako hyperlipidémie s vysokou hladinou oxLDL, změny lipidového složení dutinek způsobené vysokými hladinami oxLDL mohou mít za následek zhoršenou funkci eNOS (51).

Progresivní cévní změny silně připomínající aterosklerózu můžeme také pozorovat u pacientů s chronickým selháním transplantovaných orgánů, jako jsou ledviny a srdce. Studie s pacienty po transplantaci ledvin odhalily pokles exprese eNOS během rozvoje akutní rejekce. Prodloužený pokles může poskytnout vysvětlení pro silnou vazbu mezi akutní rejekcí a následným chronickým selháním transplantátu, způsobeného endoteliální dysfunkcí (52).

Imunocytochemická analýza žil transplantované tkáně ukázala na modelu potkana pokles exprese eNOS v transplantované tkáni s aterosklerózou.

Také aortální štěpy eNOS<sup>-/-</sup> myši prokázaly zvýšenou proliferaci intimy, prokázanou jako nárůst poměru intima/media ve srovnání se štěpy z Wild-Type myši (53). Odporující těmto studiím, Akyurek et al nenalezli žádné změny v expresi eNOS v aortálních štěpech potkanů s transplantovanou aterosklerózou (54).

Na rozdíl od snížené exprese eNOS u aterosklerózy, u diabetu je exprese eNOS nadregulována a je zodpovědná za intrarenální vazodilataci, která je charakteristická pro raný diabetes.

Role eNOS byla rovněž studována u různých zánětlivých onemocnění. Glomerulární exprese eNOS se snižuje u aktivní Wengerovy granulomatózy (55). Podobné poklesy byly nalezeny u experimentálních potkanů s anti-myeloperoxidase-associated crescentic glomerulonefritidou (56).

Další experimentální studie rovněž odhalily zvýšenou závažnost glomerulonefritidy, kdy byl eNOS buď blokován, nebo chyběl. Tyto studie ukazují škodlivé účinky v důsledku snížené exprese eNOS na agregaci krevních destiček a neutrofilní infiltraci vedoucí k větším a rozsáhlejším zánětům a poškozením (44).

Stejně jako v jiných situacích, rozsáhlé záněty byly u těchto onemocnění doprovázeny silnou expresí iNOS zánětlivými buňkami. Naopak, u pacientů se zánětlivým onemocněním střev byla hladina exprese eNOS v cévách normální.



## 6. Myší model aterosklerózy

První doklady o experimentální ateroskleróze pocházejí z roku 1908, kdy Ignatowski demonstroval ztlustění intimy s tvorbou velkých jasných buněk v aortě králíků krmených stravou bohatou na živočišné bílkoviny (57).

Do roku 1992, byla většina aterosklerotického výzkumu zaměřena na mechanismy u králíků, méně pak u prasat a primátů. Tyto velké zvířecí modely poskytly cenné poznatky. Využití prasečích modelů nemoci nejprve ukázalo, že infiltrace monocytů byla jedním z primárních buněčných jevů v aterogenním procesu (58). Studie na opicích a králících byly klíčové při definování buněčných jevů při zahájení a rozvoji lézí.

V posledních letech došlo k explozi in vivo experimentů na myších modelech. Běžná myš není schopna rozvoje aterosklerózy. Důvodem je nízká hladina cholesterolu a to hlavně v HDL frakci. Jedinou výjimkou je kmen C57BL/6 (59).

Prvním myším modelem byl diet – induced model, který byl poprvé využit v 60. letech ve Wisslerově laboratoři. Speciální dieta obsahující 30% tuků, 5% cholesterolu a 2% kyseliny cholové vedla k ateroskleróze myší kmene C57BL/6. Tato strava byla toxická a způsobovala úbytek váhy a často respirační infekce. Paigen a spol. upravili tuto dietu na složení 10% tuků, 1,25% cholesterolu a 0,5% kyseliny cholové a krmení od 14. týdne do 9. měsíce (60).

Nevýhodou tohoto modelu jsou velmi malé léze. Vznikají v aortálním kořeni a sestávají výhradně z pěnových buněk a hladkých svalových buněk. Strava je nefyziologická s ohledem na mimořádně vysoký obsah cholesterolu a kyseliny cholové. Lusis a spol. prokázali, že tato strava je sama o sobě prozánětlivá, vede k indukci jaterní NF- $\kappa$ B a k expresi reaktantů akutní fáze např. sérového amyloidu A (61).

Paigen a spol. vyvinuli metody ke stanovení aterosklerózy u modelů myší. Srdce je fixované ve formalínu, vložené do želatiny, zmrazené a nakrájené na velmi tenké díly z anatomicky definovaných míst aortálního oblouku a oblasti chlopně. Řezy jsou poté barveny pro lipidy a plocha léze se měří mikroskopicky (60).

Dalším modelem využívaným pro studium aterosklerózy je kmen s dvojitým deficitem apoE (apolipoproteinu) a LDLr (LDL receptoru). Představuje nový typ myši, u kterého se vyvíjí těžká hyperlipidémie a ateroskleróza. Při pravidelném příjmu potravy je progres aterosklerózy obvykle výraznější u kmene myši s dvojitým deficitem apoE/LDLr než u myši trpících nedostatkem samotného apoE (62).

Existuje mnoho výhod používání myši pro experimentální výzkum aterosklerózy. Jejich generační doba je krátká, kolem 9 týdnů. Je snadné chovat velké skupiny pro experimentální studie, lze u nich rozvinout aterosklerózu ve velmi krátkém čase. Jednou z hlavních výhod je velmi kvalitní analýza genomu kmene myši C57BL/6J, díky které je možné genetickým inženýrstvím vyřadit či nahradit endogenní geny (63).

Na druhou stranu mají myši modely určitá omezení, mezi které rozhodně patří jejich malá velikost. Ztěžuje provádění chirurgických zákroků a in vivo zobrazování. Nedávno byly překonány problémy s velikostí u některých metod. Dnes je možné skenování břišních aterosklerotických lézí u živých myši, srdeční katetrizace ke stanovení kardiovaskulárních funkcí, u chirurgické ligatury koronárních tepen vedoucích k ischemii myokardu.

## **7. Cíl práce**

Cílem této práce bylo zjistit a popsat expresi endoteliální NO syntázy (eNOS) jako jednoho z koncových členů kaskády pro transformující růstový faktor beta v aterosklerotických plátech u apoE/LDLr deficientních myší s ohledem na podávání atorvastatinu za použití imunohistochemických metod. Cílem bylo prokázat jestli atorvastatin ovlivňuje expresi eNOS bez hypolipidemických účinků.

## **8. Experimentální část**

Samice kmene C57BL/6J s dvojitým deficitem apoE/LDLr, vážící 15–20 gramů, byly zakoupeny v Taconic Europe (Dánsko) a ustájeny ve zvěřinci Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

### **8.1 Zvířata a předepsaná dieta**

U všech myší byl zahájen výkrm experimentálními dietami ve věku 8 týdnů. Zvířata byla náhodně rozdělena do 2 skupin. Kontrolní, které byla podávána pouze standardní dieta a atorvastatinové, které byla podávána standardní dieta obohacena o 50 mg atorvastatinu na 1 kg váhy denně.

Obě skupiny byly krmeny experimentálními dietami po dobu 8 týdnů. Každá z myší byla chována v samostatné kleci. Dostávaly denně 6 g potravy (ve speciálně upravených granulích) a měly volný přístup k vodě po celou dobu studie. Během experimentu nebyly nalezeny změny tělesné hmotnosti v souvislosti se spotřebou potravy.

Na konci experimentu byla zvířata přes noc vylačněna a bylo provedeno usmrcení předávkováním v parách éteru. Zvířatům byly odebrány ze srdce vzorky krve pro biochemické vyšetření. Dále byly odebrány segmenty tkáně tvořené aortou spolu s horní polovinou srdce. Tyto segmenty se ponořily do OCT media (Leica, Praha, Česká republika), následně byly zmrazeny v tekutém dusíku a uskladněny při minus 80°C.

### **8.2 Biochemická analýza**

Biochemická analýza vzorků krve byla provedena na gerontologické a metabolické klinice Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Celkové koncentrace cholesterolu byly hodnoceny enzymaticky na základě konvenčních diagnostických metod (Lachema, Brno, Česká republika) a spektrofotometrické analýzy (cholesterol při 510 nm, triglyceridy při 540 nm vlnové délky) (ULTROSPECT III, Pharmacia LKB biotechnologie, Uppsala, Švédsko).

### 8.3 Histologické barvení olejovou červení

Barvení olejovou červení se používá k detekci lipidů ve tkáních. Zde byla tato metodika použita pro stanovení množství lipidů v aterosklerotických lézích.

*Postup barvení olejovou červení:*

#### **Barvení Oil Red O:**

- |                             |                  |
|-----------------------------|------------------|
| 1) Oil Red O                | 15 minut         |
| 2) pramenitá voda           | oplach           |
| 3) Hill hematoxylin         | asi 5 sekund, RT |
| 4) pramenitá voda           | modrání 1 minuta |
| 5) montování nevodné medium |                  |

Zásobní roztok Oil Red O se připraví rozpuštěním 0,5 g Oil Red O ve 100 ml isopropanolu. Pracovní roztok se připravuje v čas potřeby z 60 ml zásobního roztoku smíchaného se 40 ml destilované vody a filtruje se přes papírový filtr.

### 8.4 Imunohistochemie

Veškerá imunohistochemická barvení byla provedena na cévách získaných z geneticky modifikovaného kmene myši. Jednalo se o samice kmene C57BL/6J s dvojitým deficitem apoE/LDLr vážící 15-20 gramů.

Odebrané segmenty tkáně tvořila aorta spolu s horní polovinou srdce. Tyto segmenty byly ponořeny do zmrazovacího média (tissue freezing medium) (Leica, Praha, Česká republika), následně byly zmrazeny v tekutém dusíku a uskladněny při minus 80°C. Imunohistochemická analýza byla provedena v 1 cm aortálního sinu a části aortálního oblouku. Pro hodnocení byly nakrájeny série příčných řezů o tloušťce 7 µm na zmrazovacím mikrotomu.

Pro detekci exprese eNOS byla použita metodika EnVision s detekcí pomocí DAB, který poskytuje v místě detekce antigenu ve tkáni hnědou barevnou reakci.

#### **8.4.1 Primární protilátky**

Pro detekci exprese eNOS v cévní stěně jsme použili pro světelnou mikroskopii stejnou monoklonální protilátku: rabbit Anti-Mouse eNOS ve zředění 1/100 (Santa Cruz, USA).

#### **8.4.2 Sekundární protilátky**

Jako sekundární protilátka byla pro světelnou mikroskopii použita monoklonální protilátka Goat Anti-Rabbit EnVision (*DAKO, Carpinteria, USA*).

#### **8.4.3 Detekční systémy**

K vizualizaci navázaných protilátek ve světelném mikroskopu jsme použili diaminobenzidin (DAB substrát-chromogen roztok, DAKO, Carpinteria, USA).

Fotodokumentace a digitalizace snímků z fluorescenčního mikroskopu Olympus BX byla provedena digitální kamerou Pixelink PL-A642 (Vitana Corp., USA) za pomoci softwaru LUCIA verze 5.0 (Laboratory Imaging Prague, Česká republika).

#### **8.4.4 Pracovní postup - *EnVision* systém**

Tkáňové řezy byly přeneseny na sklíčka předem upravená v roztoku želatiny. Po oschnutí (60 minut) se na 15 minut vložily do roztoku acetonu uchovávaného v minus 20°C. Poté se řezy nechaly usušit (15 minut) a znovu se vložily na 15 minut do acetonu. Tímto procesem došlo k fixaci řezů a jejich lepší adhezi na podložní sklíčko. Po patnáctiminutovém usušení se řezy vložily do roztoku PBS (2x5 minut).

Před inkubací řezů s primární protilátkou bylo nutné zablokovat nespecifická vazebná místa třicetiminutovou inkubací s 10% roztokem goat séra (Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Německo) v PBS.

Sklíčka se pak 1 hodinu inkubovala s primární protilátkou při pokojové teplotě. Poté se řezy vložily do roztoku PBS (2x5minut) a dále do 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (15 minut).

Po oplachu v PBS (2x5minut) se řezy 30 minut inkubovaly se sekundární

protilátkou anti-rabbit EnVision a opět se vložily do roztoku PBS (2x5 minut).

K vizualizaci navázané protilátky se použil chromogen DAB (DAKO, Carpinteria, USA). Na závěr byly řezy opláchnuty v acetonu a odvodněny v aceton-xylen (10:1) (3 minuty), aceton-xylen (1:10) (3 minuty) a v xylen (3 x 2 minuty). Na závěr byla sklíčka zamontována do Eukittu.

### ***Pracovní postup***

#### ***EnVision systém – detekce exprese eNOS***

- 1) sušení tkáňových řezů v termostatu (60min)
- 2) fixace v acetonu (-20°C; 30min)
- 3) oschnutí řezů (15min)
- 4) promytí v PBS (2 x 5 min)
- 5) aplikace 10% blokujícího zvířecího séra (30 min)
- 6) aplikace primární protilátky (inkubace 60 min)
- 7) promytí v PBS (2 x 5 min)
- 8) promytí v 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (15 min)
- 9) promytí v PBS (2 x 5 min)
- 10) aplikace sekundární protilátky (inkubace 30 min)
- 11) promytí v PBS (2 x 5 min)
- 12) inkubace s roztokem chromogenu (DAB) (dobu inkubace různá pro každou protilátku)
- 13) oplach řezů v acetonu
- 14) odvodnění řezů (aceton)
- 15) odvodnění řezů (aceton-xylen 10/1) (3 min)
- 16) odvodnění řezů (aceton-xylen 1/10) (3 min)
- 17) odvodnění řezů (xylen) (3 x 2 min)
- 18) montování řezů do Eukittu

## 8.5 Statistická analýza

Všechny hodnoty v grafech jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SEM (střední chyba průměru) pro 8 zvířat v každé skupině. Ke vzájemnému porovnání parametrů u atorvastatinové a kontrolní skupiny byl použit nepárový T test. Rozdíly mezi skupinami byly statisticky významné v případě, že  $p \leq \alpha$ , kde  $\alpha=0,05$ . K výpočtu byl použit GraphPad Prism software (verze 4.0).



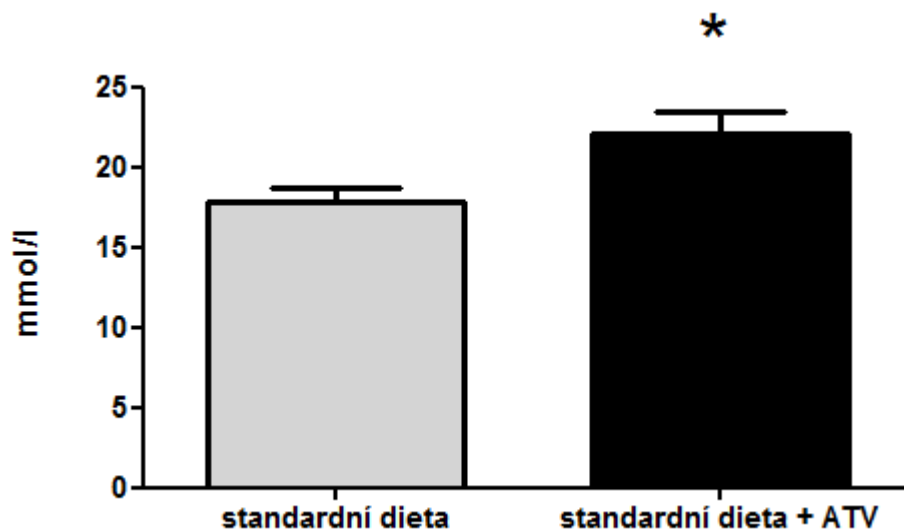
## 9. Výsledky

### 9.1 Biochemická analýza

U všech myší v experimentu byly stanoveny hladiny celkového cholesterolu. Výsledky prokázaly, že osmitýdenní podávání atorvastatinu v dávce 50 mg/kg statisticky významně zvýšilo hladiny celkového cholesterolu (viz. Graf 1).

**Graf 1: Hladiny celkového cholesterolu u experimentálních myší.**

*Osmítýdenní podávání atorvastatinu statisticky významně zvýšilo hladiny celkového cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou. (\* $P \leq 0,05$ ).*

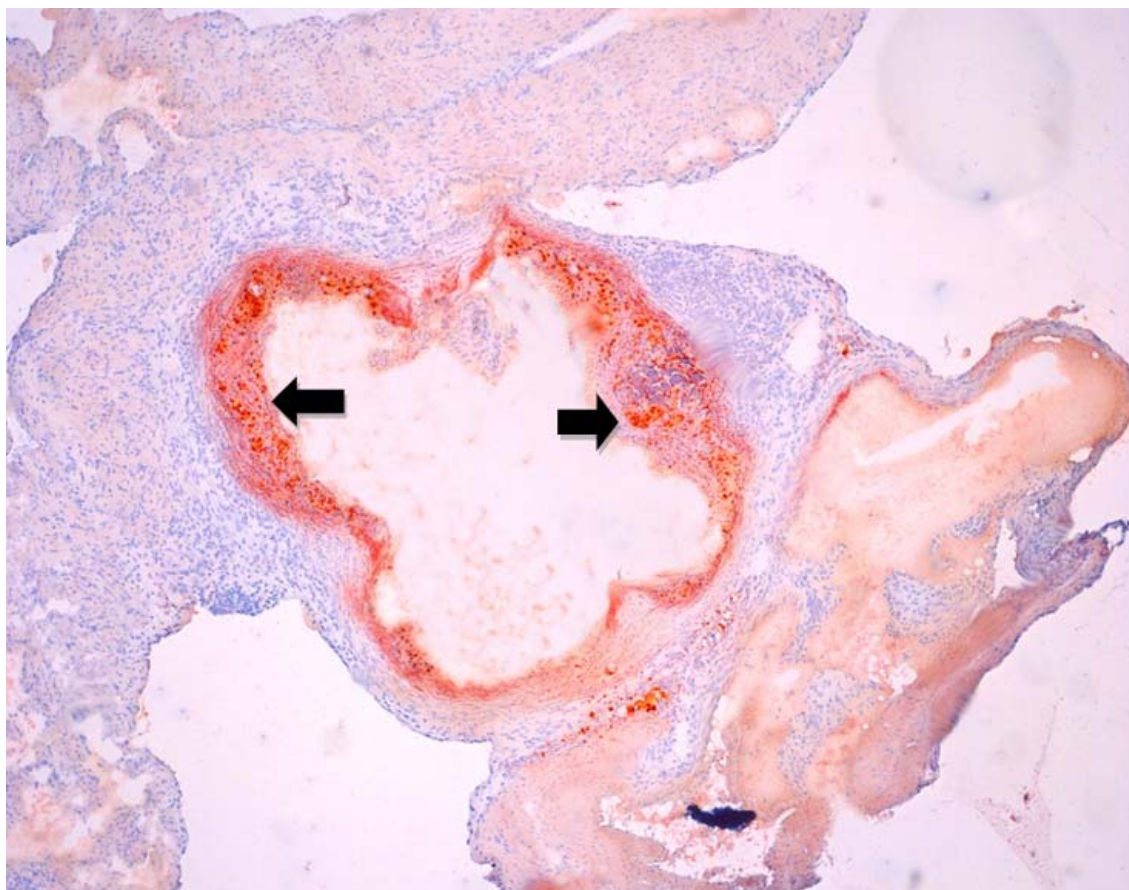


## **9.2 Histologické barvení olejovou červení**

Barvení olejovou červení bylo provedeno za účelem hodnocení velikosti aterosklerotických plátů u myši krmených standardní dietou a u myši krmených atorvastatinem. U všech řezů v kontrolní i atorvastatinové skupině byla pozorována přítomnost aterosklerotických lézí (viz. Obr. 4 a 5). Léze byly největší v oblasti aortálního sinu, ale pokračovaly také v oblasti aortálního oblouku, kde se však jejich velikost snižovala. Podávání atorvastatinu vedlo k výraznému poklesu velikosti aterosklerotických plátů (plocha barvení olejovou červení) ve srovnání s neléčenou skupinou (obr. 5).

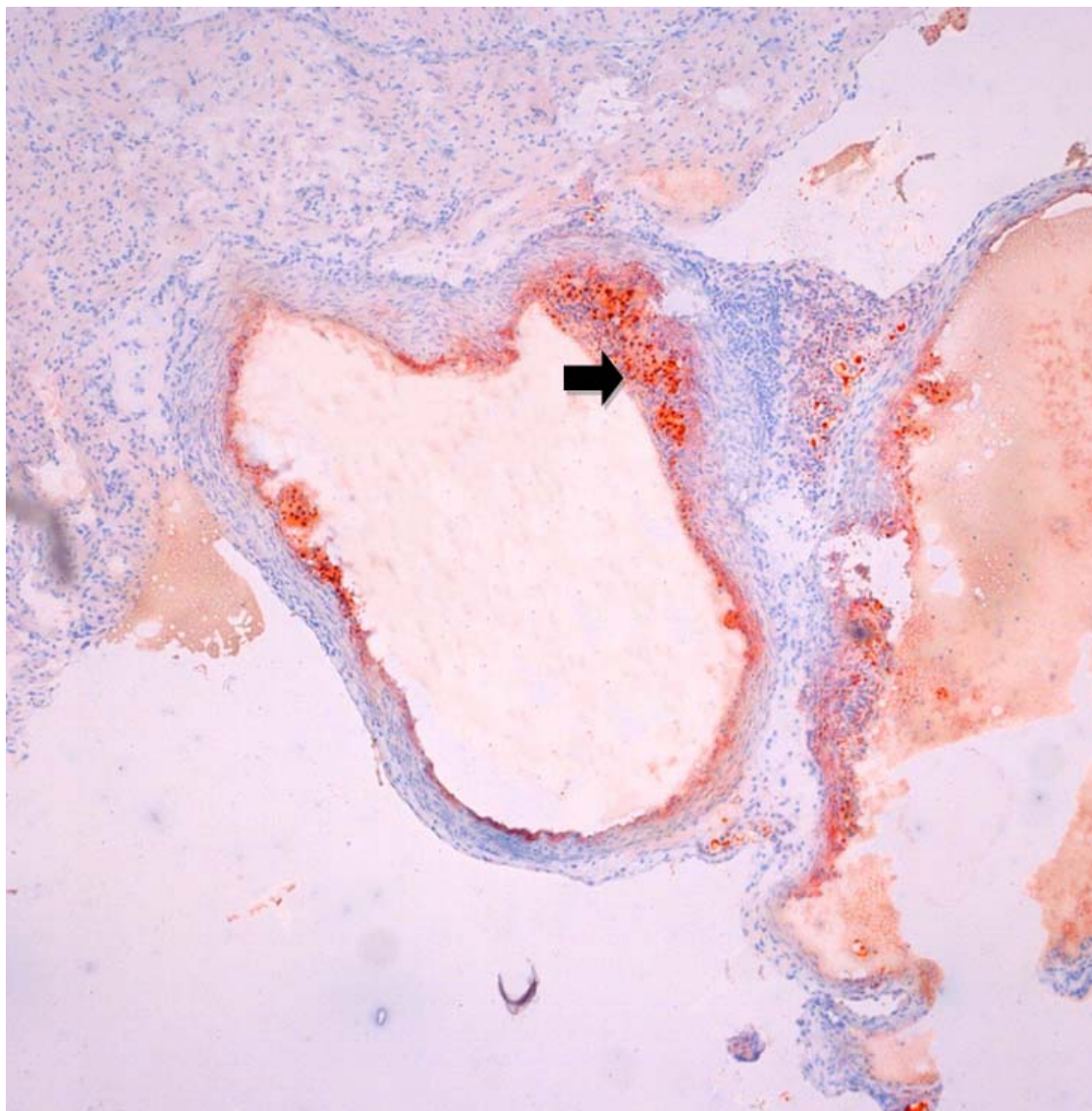
***Obrázek 4: Reprezentativní obrázek barvení olejovou červení u kontrolní skupiny zvířat, kterým byla podávána 8 týdnů standardní dieta.***

**Šipky ukazují na akumulaci lipidů v aterosklerotických lézích. Zvětšení preparátu 40x.**



***Obrázek 5: Reprezentativní obrázek barvení olejovou červení u atorvastatinové skupiny zvířat, kterým byla podávána 8 týdnů standardní dieta.***

Šipky ukazují na akumulaci lipidů v aterosklerotických lézích. Intenzita a plocha barvení olejovou červení je výrazně snížena ve srovnání s kontrolní skupinou. Zvětšení preparátu 40x.



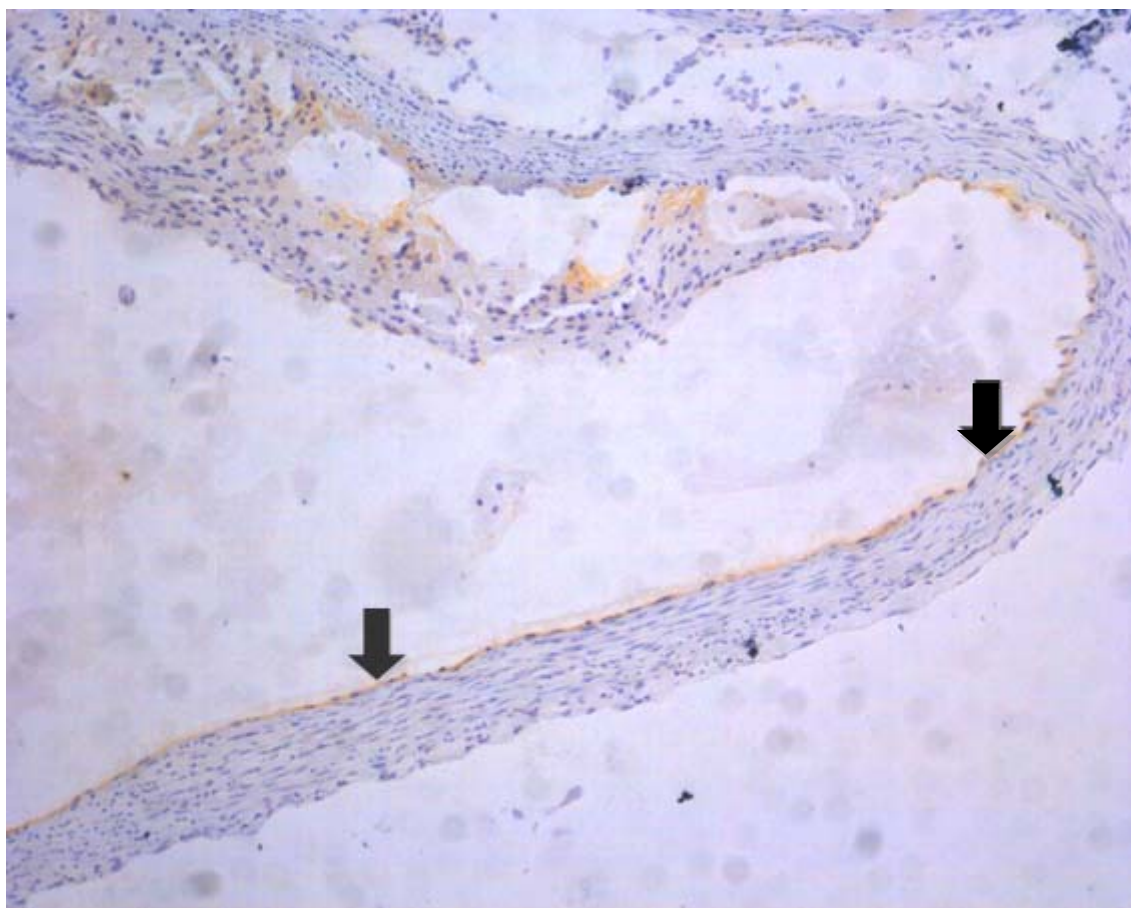
## 9.3 Imunohistochemická analýza

### 9.3.1 Imunohistochemické barvení eNOS v oblasti aortálního sinu

Expres eNOS byla pozorována hlavně v cévním endotelu, a to jak v oblasti mimo aterosklerotické léze tak také na povrchu plátů. (viz obr. 6). Podávání atorvastatinu dále vedlo k výraznému navýšení exprese eNOS zejména na povrchu aterosklerotických plátů ve srovnání s kontrolní skupinou (viz obr. 8-9).

***Obrázek 6: Reprezentativní obrázek imunohistochemického barvení eNOS u kontrolní skupiny.***

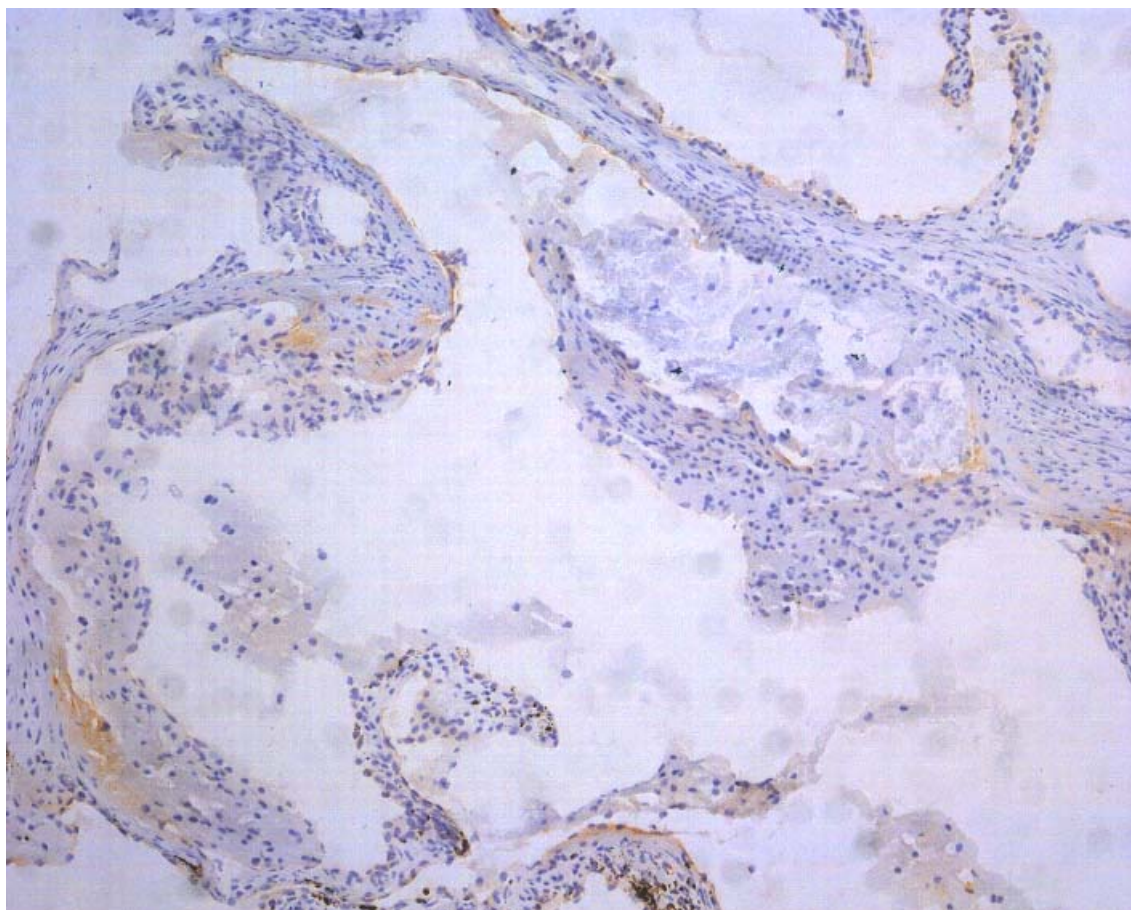
Slabá exprese eNOS je detekována zejména na intaktním endotelu (šipky). Naproti je exprese eNOS téměř nedetekovatelná na povrchu aterosklerotických plátů. Buněčná jádra jsouobarvena hematoxylinem. Zvětšeno 200x





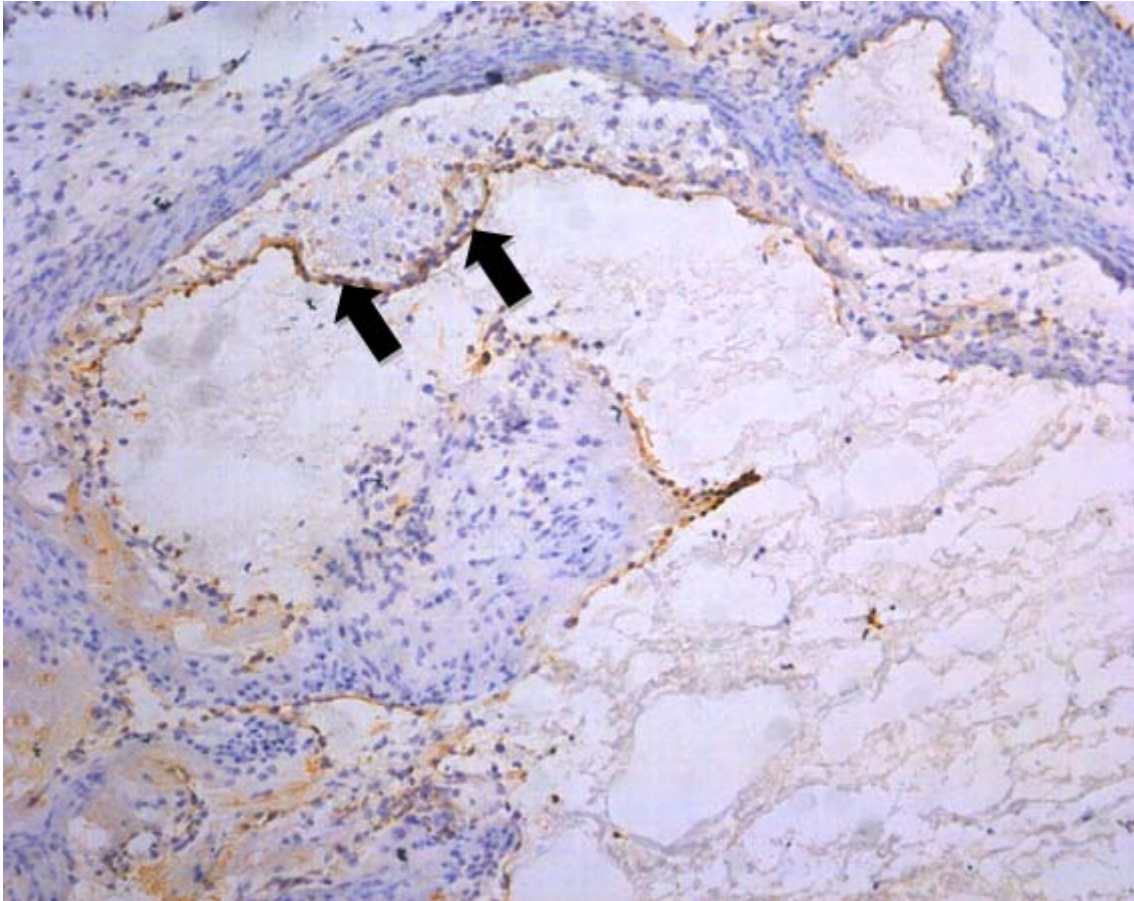
***Obrázek 7: Reprezentativní obrázek imunohistochemického barvení eNOS u kontrolní skupiny.***

Exprese eNOS téměř nedetekovatelná na povrchu aterosklerotických plátů. Buněčná jádra jsou dobarvena hematoxylinem. Zvětšeno 100x



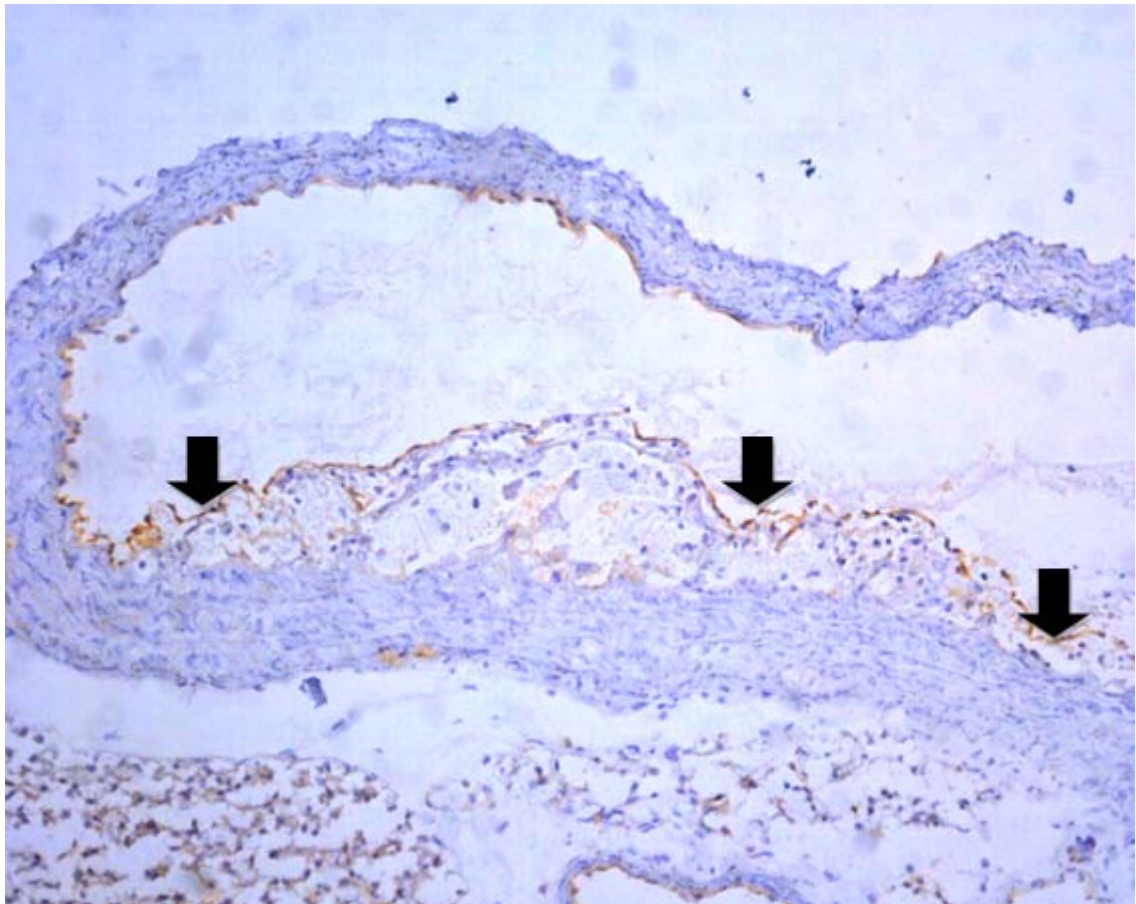
***Obrázek 8: Reprezentativní obrázek imunohistochemického barvení eNOS u atorvastatinové skupiny.***

Exprese eNOS je mnohem výraznější na povrchu aterosklerotických plátů ve srovnání s kontrolní skupinou. Buněčná jádra jsou dobarvena hematoxylinem. Zvětšeno 100x.



***Obrázek 9: Reprezentativní obrázek imunohistochemického barvení eNOS u atorvastatinové skupiny.***

Exprese eNOS je mnohem výraznější na povrchu aterosklerotických plátů ve srovnání s kontrolní skupinou. Buněčná jádra jsou dobarvena hematoxylinem. Zvětšeno 100x.





## 10. Diskuse

Ateroskleróza je chronické zánetlivé onemocnění cév, zejména arterií, které je příčinou řady významných zdravotních komplikací jako je infarkt myokardu, cévní mozková příhoda, nebo angina pectoris (64).

Za základní a první krok v patogenezi aterosklerózy je dnes považována endoteliální dysfunkce charakterizovaná aktivací endotelu s následnou expresí zánětlivých, proliferačních a vazokonstrikčních markerů. Klíčovým enzymem v tomto procesu je endoteliální NO syntéza, která produkuje oxid dusnatý NO. Oxid dusnatý (NO) je multifunkční faktor, který slouží jako klíčová signální molekula ve fyziologických procesech jako je obranyschopnost, neuronální komunikace a regulace cévního tonu (65). NO se celkově podílí na inhibici zánětlivé reakce na endotelu a je protektivní vůči rozvoji endoteliální dysfunkce. Přestože je NO nezbytná molekula, jeho tvorba není vždy prospěšná, nadbytek nebo nedostatek produkce NO může mít škodlivé účinky na (pato) fyziologické procesy. Existují tři různé izoformy syntázy oxidu dusnatého, které můžeme rozdělit do 2 funkčních tříd. První skupina je základní třída, do které patří endoteliální NOS (eNOS) a neuronální NOS (nNOS). Enzym eNOS se tvoří v endoteliálních buňkách, krevních destičkách, buňkách hladké svaloviny, srdečních myocytech, kostních buňkách a v neuronech (45) a je považován za protektivní faktor z hlediska aterogeneze.

Funkce eNOS je také sledována vzhledem k aktivaci kaskády pro transformující růstový faktor, což je také jeden z důvodů proč byla jeho exprese sledována v této diplomové práci (66). Řada studií právě prokázala, že eNOS exprese a aktivita je zvyšována po aktivaci kaskády TGF- $\beta$ , což má pozitivní vliv na funkci cévního endotelu, zejména expresi adhezních molekul a vazodilatační charakteristiky cévy (67).

Statiny patří dnes jednoznačně k nejpoužívanějším léčivům ze skupiny hypolipidemik v humánní medicíně. Dnes je klinicky jednoznačně přijímáno, že statiny díky inhibici klíčového enzymu syntézy cholesterolu, HMG-CoA reduktázy, snižují tvorbu cholesterolu v játrech, což následně vede k „upregulaci“ LDL receptoru, zvýšenému clearance LDL lipoproteinů a tím k finálnímu výsledku statinové terapie, tedy snížení LDL cholesterolu (68). Kromě těchto efektů vykazují statiny také

tzv. pleiotropní účinky, což jsou účinky, které souvisí s inhibicí celé kaskády syntézy cholesterolu, ale ne přímo se snížením hladin cholesterolu (69).

ApoE/LDL receptor deficientní myši vyvíjí výraznou spontánní hypercholesterolemii a aterosklerotické léze již v pátém týdnu svého života. V osmém týdnu, již mají pokročilé léze v oblasti aortálního sinu, jejichž vývoj lze samozřejmě ještě urychlit podáváním aterogenní diety. Z tohoto důvodu je tento model považován za velmi dobrý zvířecí model pro studium hypolipidemik (70).

Cílem této diplomové práce bylo sledovat expresi eNOS u apoE/LDLR-deficientních myších v aortě po podávání atorvastatin. Výsledky biochemické prokázaly, že podávání statinů vedlo ke zvýšení hladin cholesterolu. Tento zajímavý výsledek byl však již pozorován v některých minulých studiích. Řada prací totiž prokázala, že statiny u těchto myší nemají hypolipidemické účinky, ale naopak hladiny cholesterolu jsou buď nezměněny, nebo jsou dokonce zvýšeny (71). Tento netypický efekt po podání statinů byl nedávno částečně objasněn, přičemž se uvažuje o tom, že statiny zvyšují produkci defektních VLDL v játrech, které jsou bohaté na cholesterol a mají nižší obsah triacylglycerolů (72). Nicméně tento „nehypolipidemický“ účinek statinů u apoE<sup>-/-</sup> myší byl do jisté míry využit pro studium tzv. pleiotropních (přímých, na lipidech nezávislých) účinků statinů u tohoto modelu (71). Také v této studii jsme tohoto fenoménu využili pro sledování chování členů TGF- $\beta$  kaskády.

U statinů již bylo prokázáno, že ovlivňují expresi eNOS na cévním endotelu (73). Také předcházející studie prokázala zvyšování exprese některých členů TGF- $\beta$  kaskády po podávání atorvastatinu, nicméně zde nebylo možno vyloučit vliv hypolipidemického efektu atorvastatinu (74). V této práci jsme pozorovali výrazně zvýšení exprese eNOS na cévním endotelu zejména aterosklerotických plátů po podávání atorvastatinu, což bylo doprovázeno také snižováním velikosti aterosklerotických plátů. Tyto efekty podávání atorvastatinu se tedy objevily bez jeho hypolipidemického efektu. V této chvíli nemůžeme tvrdit, že zvýšení exprese eNOS souvisí se snižováním velikosti plátů, nicméně naše výsledky jasně dokazují pozitivní vliv podávání atorvastatinu na expresi člena TGF- $\beta$  kaskády a to bez hypolipidemického účinku.

## 11. Závěr

Výsledky této diplomové práce prokázaly expresi jednoho z členů TGF- $\beta$  kaskády, endoteliální NO syntézy (eNOS) v aterosklerotických plátech v cévní stěně u apoE/LDLR deficientního myšího modelu aterosklerózy.

Exprese eNOS byla lokalizována na cévním endotelu, a to jak na povrchu aterosklerotických plátů tak i mimo ně.

Podávání atorvastatinu v dávce 50 mg/kg/den vedlo k výraznému hyperlipidemickému efektu.

Navzdory tomuto jevu byla snížena velikost plochy aterosklerotických plátů.

Navíc byla prokázána výraznější exprese eNOS u zvířat, kterým byl podáván atorvastatin.

V této chvíli nemůžeme tvrdit, že zvýšení exprese eNOS souvisí se snižováním velikosti plátů, nicméně naše výsledky jasně dokazují pozitivní vliv podávání atorvastatinu na expresi člena TGF- $\beta$  kaskády a to bez hypolipidemického účinku.

## 12. Seznam zkratek

AKS	akutní kornární syndrom
AP	angina pectoris
apoE	apolipoprotein E
BMI	body mass index
CETP	cholesteryl ester transfer protein
cGMP	cyklický guanosin monofosfát
CMP	cévní mozková příhoda
CO	oxid uhelnatý
CRP	C-reaktivní protein
CSF	kolonie stimulující faktor
EDHF	endotelem odvozený hyperpolarizační faktor
eNOS	endoteliální syntáza oxidu dusnatého
HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě
HMG-CoA	hydroxy-methylglutaryl-koenzym A
ICAM	intracelulární adhezní molekula
ICHDK	ischemická choroba dolních končetin
ICHS	ischemická choroba srdeční
IL-6	interleukin 6
IM	infarkt myokardu
iNOS	inducibilní syntáza oxidu dusnatého
L-NAME	methylester L-nitro-argininu
L-NMMA	L-nitro-monomethyl arginin
LCAT	lecitin cholesterol acyltransferáza
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě
LDLr	LDL receptor
Lp(a)	lipoprotein (a)
M-CSF	monocyty kolonie stimulující faktor
MCP-1	monocyty přitahující protein
MMP	matrix metaloproteináza
MRI	magnetická rezonance

NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát, redukována forma
nNOS	neuronální syntáza oxidu dusnatého
NO	oxid dusnatý
NOS	syntáza oxidu dusnatého
oxLDL	oxidovaný LDL
PDGF	růstový faktor z krevních destiček
SAA	sérový amyloid A
TG	triglyceridy
TGF- $\beta$	růstový transformační faktor $\beta$
TK	tlak krve
VCAM	adhezní molekula cévních buněk
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě

### 13. Literatura

1. [www.pfizer.cz/files/vase\\_zdravi/ateroskleroza/Vite\\_jak\\_na\\_aterosklerozu\\_1\\_čas\\_t.pdf](http://www.pfizer.cz/files/vase_zdravi/ateroskleroza/Vite_jak_na_aterosklerozu_1_čas_t.pdf).
2. Jarkovská D., Martínek J.: Histologie I. Karolinum, Praha, 1997, str. 54.
3. Konrádová V., Uhlík J., Vajner L.: Funkční histologie. Jinočany, 2000, 117-122.
4. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis - a perspective for the 1990s. Nature 1993; 362: 801-809.
5. Pířha J, Roztočil K, Cífková R et al. Endoteliální dysfunkce a její hodnocení. Cor et Vasa 2001; 43: 452-456.
6. Davies PF. Flow mediated endothelial mechanotransduction. Physiol Rev 1995; 75: 519-560.
7. Born G, Rabelik T, Smith T. Endothelium and Cardiovascular Disease. London: Science Press Ltd, 1998; 50.
8. Masaki T. Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone. Annual Rev Pharmacol Toxicol 1995; 35: 235-255.
9. Vogel RA. Coronary risk factors, endothelial function and atherosclerosis: a review. Clin Cardiol 1997; 20: 1468-1474.
10. Luoma J et al. Expression of extracellular SOD and iNOS in macrophages and smooth muscle cells in human and rabbit atherosclerotic lesions: colocalisation with epitopes characteristic of oxidised LDL and peroxynitrite modified proteins. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998; 18: 157-167.
11. Sary HC. Macrophages, macrophage foam cells and eccentric intimal thickening in the coronary arteries of younger children. Atherosclerosis 1987; 64: 91-108.
12. <http://www.solen.cz/pdfs/int/2002/02/07.pdf>, str.1-2.
13. Moreno PR, Falk E, Palacios IF et al. Macrophage infiltration on acute coronary syndromes. Implication for plaque rupture. Circulation 1994; 90: 775-778.
14. Guyton JR, Klemp KF. Development of the atherosclerotic core region. Chemical and ultrastructural analysis of microdissected atherosclerotic lesions from human aorta. Arterioscler Thromb 1994; 14: 1305-1314.

15. Blankenhorn DH. Coronary artery calcification. A review. *Am J Med Sci* 1961; 242: 41-49.
16. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995; 92: 657-661.
17. Toussaint JF, Pachot-Clouard M, Kantor HL. Tissue characterization of atherosclerotic plaque vulnerability by nuclear magnetic resonance. *Cardiovasc Magn Reson* 2000; 2: 225-232.
18. Špaček R. Srdce a kouření. *Cor et Vasa* 2002; 43: 505-512.
19. Stamler J, Vaccaro O, Neaton J D et al. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention trial. *Diabetes Care* 1993; 16: 434-444.
20. Schulte H, Cullen P, Assmann G. Obesity, mortality and cardiovascular disease in the Münster Heart Study (PROCAM). *Atherosclerosis* 1999; 144: 199-209.
21. Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PWF et al. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels: The Framingham Study. *JAMA* 1986; 256: 2835.
22. Jančík J, Dobšák P, Kožantová L et al. Changes in aerobic exercise capacity in patients with chronic ischemic heart disease: Effect of 8-week exercise training. In: Halberg F, Kenner T, Fišer B, eds. *The Importance of Chronobiology in Diagnosing and Therapy of Internal Diseases*. Brno: IDVPZ, 2002; 206.
23. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA et al. Inflammation, pravastatin, and the risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. *Circulation* 1998; 98: 839-844.
24. Castelli WP: Epidemiology of triglycerides: a view from Framingham. *Am J Cardiol* 1992; 70: 3H-9H.
25. Mölgaard J, Klausen CH, Lassvik C et al. Significant association between low-molecular-weight apolipoprotein(a) isoforms and intermittent claudication. *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 895-901.
26. Anderson JL, Carlquist JF, Muhlestein JB et al. Evaluation of C-reactive protein, an inflammatory marker, and infectious serology as risk factors for coronary artery disease and myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 35-41.

27. Linzzo G, Biasucci L, Gallimore J et al. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 1994; 331: 417-424.
28. Evans M, et al. The future direction of cholesterol-lowering therapy. *Cur Opinon Lipidol* 2002; 13: 663–669.
29. [www.solen.cz/pdfs/int/2003/10/07.pdf](http://www.solen.cz/pdfs/int/2003/10/07.pdf), str. 3.
30. Lincová D., Farghali H. et al. *Základní a aplikovaná farmakologie*. Galén 2.vydání, 2007, str. 266
31. Cooke JP, Creager MA. Hypercholesterolemia, atherosclerosis, and the NO synthase pathway. *Vascular endothelium in human physiology and pathophysiology*. Vallance PTJ, Webb DJ. London: Harwood Academic Publisher 2000: 147–170.
32. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K et al. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 2001; 103: 2885–2890.
33. Aikawa M, Rabkin E, Sugiyama S et al. An HMG–CoA reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases and tissue factor in vivo and in vitro. *Circulation* 2001; 103: 267–283.
34. Corti R, Fayad ZA, Fuster V et al. Effects of lipid-lowering by simvastatin on human atherosclerotic lesions: a longitudinal study by high-resolution, noninvasive magnetic resonance imaging. *Circulation* 2001; 104: 249–252.
35. Rauch U, Osende JI, Chesebro JH et al. Statins and cardiovascular diseases: the multiple effects of lipid-lowering therapy by statins. *Atherosclerosis* 2000; 153: 181–189.
36. Pucetti L, Bruni F, Bova G et al. Role of platelets in tissue factor expression by monocytes in normal and hypercholesterolemic subjects. In vitro effect of cerivastatin. *Int J Clin Lab Res* 2000; 30: 147–156.
37. Porreca E, Di Febbo C, Amore C et al. Effects of lipid lowering treatment on factor VII profile in hyperlipidemic patients. *Thromb Haemost* 2000; 84: 789–793.
38. Faggiotto A, Paoletti R. Do pleiotropic effects of statins beyond lipid alterations exist in vivo? What are they and how do they differ between statins? *Curr Athero Reports* 2000;2:20 –25.



39. Palomaki A, Malminiemi K, Solakivi T, Malminiemi O. Ubiquinone supplementation during lovastatin treatment: effect on LDL oxidation ex vivo. *J Lipid Res* 1998;39:1430–1437.
40. Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E, for the Heart, and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. *JAMA* 1998;280:605–613.
41. Herrington DM, Reboussin DM, Brosnihan KB, Sharp PC, Shumaker SA, Snyder TE, Furberg CD, Kowalchuk GJ, Stuckey TD, Rogers WJ, Givens DH, Waters D. Effects of estrogen replacement on the progression of coronary-artery atherosclerosis. *N Engl J Med*. 2000;343:522–529.
42. La Rosa J.C. The American Journal of Cardiology. Vol. 88 August 1, 2001, 292-293
43. Palmer RM, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333: 664–666.
44. Heeringa P, Steenbergen E, van Goor H. A protective role for endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in glomerulonephritis. *Kidney Int* 2002; 61: 822–825.
45. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524–526.
46. Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 1994; 368: 850–853.
47. Kuhlencordt PJ, Gyurko R, Han F, *et al*. Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase doubleknockout mice. *Circulation* 2001; 104: 448–454.
48. Goumas G, Tentolouris C, Tousoulis D, Stefanadis C, Toutouzas P. Therapeutic modification of the L-arginine–NOS pathway in cardiovascular diseases. *Atherosclerosis* 2001; 154: 255–267.
49. Arnal JF, Dinh-Xuan AT, Pueyo M, Darblade B, Rami J. Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 1078–1087.

50. Lee SD, Kim DS, Shim TS, *et al.* Nitric oxide and molsidomine in the management of pulmonary hypertension in Takayasu's arteritis. *Chest* 2001; 119: 302–307.
51. Knowles JW, Reddick RL, Jennette JC, Shesely EG, Smithies O, Maeda N. Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in *eNOS*<sup>–/–</sup> *Apoe*<sup>–/–</sup> mice are ameliorated by enalapril treatment. *J Clin Invest* 2000; 105: 451–458.
52. Albrecht EWJA, van Goor H, Tiebosch ATMG, Moshage H, Tegzess A, Stegeman CA. Nitric oxide production and nitric oxide synthase in acute human renal allograft rejection. *Transplantation* 2000; 70: 1610–1616.
53. Buttery LD, Chester AH, Springall DR, *et al.* Explanted vein grafts with an intact endothelium demonstrate reduced focal expression of endothelial nitric oxide synthase specific to atherosclerotic sites. *J Pathol* 1996; 179: 197–203.
54. Akyurek LM, Fellström B, Yan ZQ, Hansson GK, Funa K, Larsson E. Inducible and endothelial nitric oxide synthase expression during development of transplant arteriosclerosis in rat aortic grafts. *Am J Pathol* 1996; 149: 1981–1990.
55. Heeringa P, Bijl M, Jager-Krikken A, *et al.* Renal expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase, and formation of peroxynitrite-modified proteins and reactive oxygen species in Wegener's granulomatosis. *J Pathol* 2001; 193: 224–232.
56. Heeringa P, van Goor H, Kallenberg CG. Expression of iNOS, eNOS and peroxynitrite-modified proteins in experimental antimyeloperoxidase associated crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* 1998; 53: 382–393.
57. Ignatowski AC. Influence of animal food on the organism of rabbits. *Seterb Izviest Imp Voyenno-Med. Akad* 1908; 16: 154-173.
58. Gerrity RG. The role of the monocyte in atherogenesis. I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *Am J Pathol* 1981; 103: 181-190.
59. Breslow JL: Mouse models of atherosclerosis. *Science* 272: 685-8, 1996.
60. Paigen B, Morrow C, Brandon C *et al.* Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis* 1985; 57: 65-73.
61. Liao F, Andalibi A, deBeer FC *et al.* Genetic control of inflammatory gene induction and Nf-kappa B-like transcription factor activation in response to an atherogenic diet in mice. *J Clin Invest* 1993; 91: 2572-2579.

62. Witting PK, Pettersson K, Ostlund-Lindqvist AM, Westerlund C, Eriksson AW, Stocker R. Inhibition by a coantioxidant of aortic lipoprotein lipid peroxidation and atherosclerosis in apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor gene double knockout mice. *FASEB J* 1999; 13: 667-675.
63. Waterson RH, Lindblad-Toh K, Birney E et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 2002; 420: 520-562.
64. DeBakey M. E. and Glaeser D. H. (2000). *Am J Cardiol* 85, 1045-1053.
65. Gross SS, Wolin MS. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 737-769.
66. Santibanez J. F., Letamendia A., Perez-Barriocanal F., Silvestri C., Saura M., Vary C. P., Lopez-Novoa J. M., Attisano L. and Bernabeu C. (2007). *J Cell Physiol* 210, 456-468.
67. Toporsian M., Gros R., Kabir M. G., Vera S., Govindaraju K., Eidelman D. H., Husain M. and Letarte M. (2005). *Circ Res* 96, 684-692.
68. Kapur N. K. and Musunuru K. (2008). *Vasc Health Risk Manag* 4, 341-353.
69. Liu P. Y., Liu Y. W., Lin L. J., Chen J. H. and Liao J. K. (2008). *Circulation*.
70. Ishibashi S., Herz J., Maeda N., Goldstein J. L. and Brown M. S. (1994). *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4431-4435.
71. Nachtigal P., Pospisilova N., Pospechova K., Jamborova G., Kopecky M., Jaynes R., Briestensky J., Santar I., Smahelova A., Solichova D., Zdansky P. and Semecky V. (2006). *Life Sci* 78, 1983-1989.
72. Fu T. and Borensztajn J. (2006). *Biochem Biophys Res Commun* 341, 1172-1176.
73. Greer J. J., Kakkar A. K., Elrod J. W., Watson L. J., Jones S. P. and Lefer D. J. (2006). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291, H2743-2751.
74. Nachtigal P., Pospisilova N., Vecerova L., Micuda S., Breckova E., Pospechova K. and Semecky V. (2009). *J Atheroscler Thromb* 16, 265-274.

